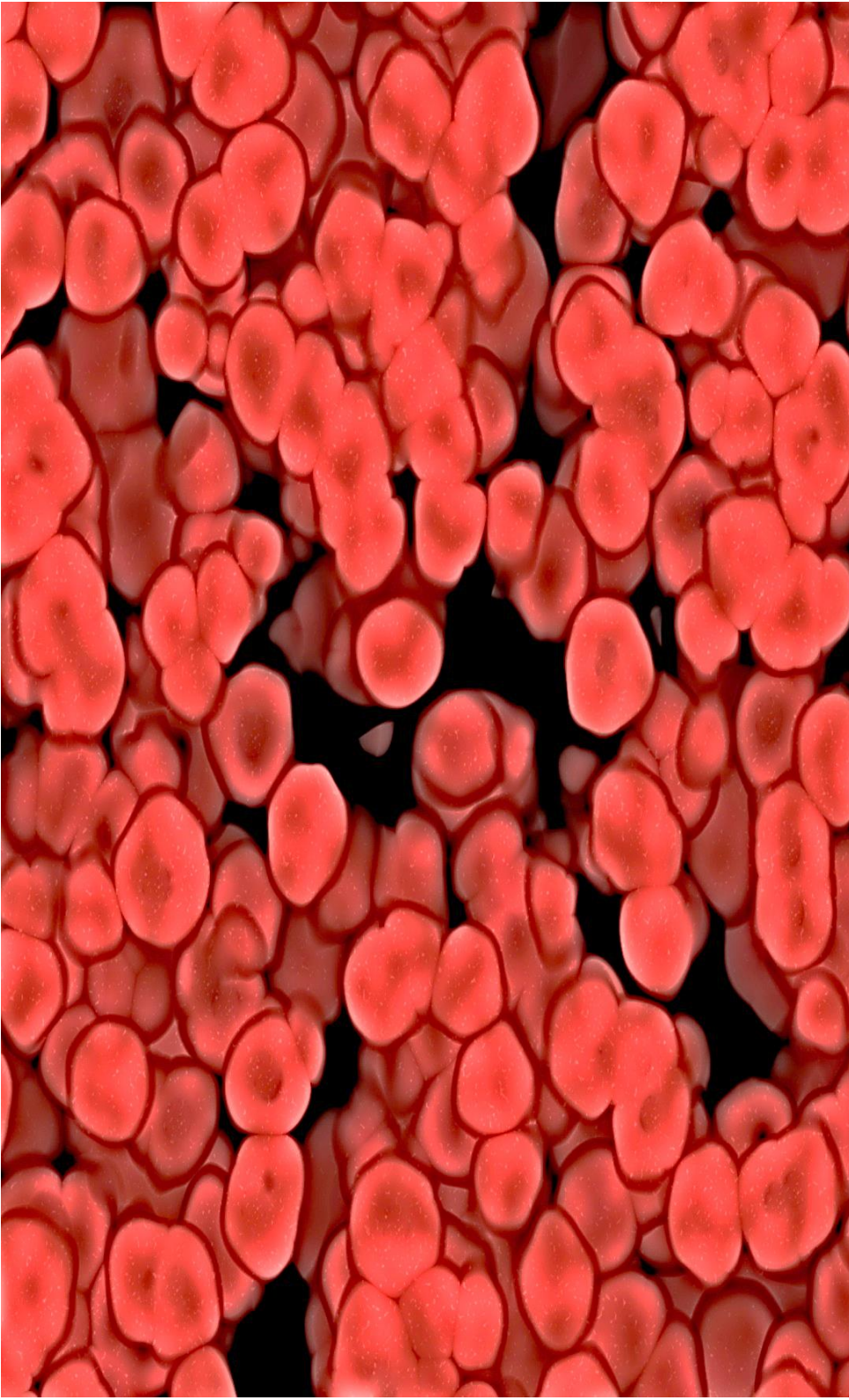


The background of the entire page is a microscopic view of numerous red blood cells. They are depicted as biconcave discs, with a prominent one in the center foreground showing its characteristic shape and texture. The cells are a deep red color against a dark, almost black, background.

Fundamentos de hematología

Bernarda Ulloa Rosero
Mercedes Tapia Cadena
Cristina Toscano Gallardo
Carlos Pozo Larco

edimec 2017



Fundamentos de hematología

**Bernarda Ulloa Rosero
Mercedes Tapia Cadena
Cristina Toscano Gallardo
Carlos Pozo Larco**

edimec 2017

ISBN 9978-978-13-119-0

© Derechos de la publicación

edimec

Edmundo Chiriboga N 47-72 y Jorge Aníbal Páez

Teléfono-facsimil: 2463402. 2463715. 0995007744. 0992546117

Quito, Ecuador

Portada CDROM. Hemoglobina. Fuente quees.la

**Editorial
EDIMEC**

Diseño, edición digital y supervisión editorial

Dr. Mauricio Medina Dávalos. Ing. Geovanny Barrera Morales

EDIMEC, Ediciones Médicas CIEZT

Edmundo Chiriboga N 47-72 y Jorge Aníbal Páez

Teléfono: 2463402. 2463715. 0995007744. 0992546117

Quito, Ecuador.

Tabla de contenidos

	Prólogo	v
Capítulo 1	Principios generales para la venopunción	1
Capítulo 2	Anticoagulantes usados en hematología	11
Capítulo 3	Frotis de sangre	17
Capítulo 4	Analizadores hematológicos automáticos o contadores hematológicos	35
Capítulo 5	Coagulación	55
Capítulo 6	Tipificación sanguínea	63
Capítulo 7	Velocidad de sedimentación globular	65
Capítulo 8	Recuento de reticulocitos	71
Capítulo 9	Alteraciones cuantitativas de la fórmula leucocitaria	75
Capítulo 10	Alteraciones cualitativas de la fórmula leucocitaria y alteraciones nucleares	79
Capítulo 11	Alteraciones de la serie roja	83
	Bibliografía	95



Prólogo

El término hematología deriva de los vocablos griegos *haimato* (αἷμα) sangre y *logia* (λογία) ciencia, conocimiento o tratado. Como especialidad médica estudia, en individuos sanos y enfermos, a los elementos constitutivos de la sangre a fin de diagnosticar, tratar e investigar patologías propias de la sangre o de los órganos hematopoyéticos (médula ósea, ganglios linfáticos y bazo). Además, su campo de acción analiza la composición celular y sérica de la sangre, el proceso de coagulación, la formación de células sanguíneas, la síntesis de la hemoglobina y los trastornos de éstos.

Examina a los elementos celulares (hematíes, leucocitos y plaquetas) y sus proporciones relativas, el estado general de las células y las alteraciones que ocurren por diversas enfermedades. Cada elemento celular cumple funciones fisiológicas específicas, así, los hematíes o glóbulos rojos tienen funciones importantes siendo el transporte de oxígeno y dióxido de carbono la más trascendental; los leucocitos o glóbulos blancos son indispensables en el sistema inmunitario mientras que las plaquetas tienen un papel preponderante en el proceso de coagulación de la sangre. Todas las células son necesarias en proporciones adecuadas, con recuentos celulares que permiten cumplir roles particulares, por lo que la hematología identificará desequilibrios.

La sangre es un tejido que en conjunto le corresponde el $10\pm 2\%$ del peso corporal; está conformada por una parte líquida conocida como **plasma sanguíneo** que es extraído en laboratorio a partir de sangre total o por centrifugación de muestras con anticoagulantes. El plasma es una solución acuosa (5% del peso corporal; le corresponde entre el 55% a 65% de la sangre total) compuesta por agua ($90\pm 2\%$), proteínas, electrolitos, factores de coagulación, moléculas orgánicas pequeñas, sustancia nitrogenada no proteica, vitaminas, oligoelementos y hormonas, entre otras.

La **fracción celular** está constituida por hematíes o eritrocitos (7 a 8 μm de diámetro), plaquetas o trombocitos (2 a 3 μm de diámetro), leucocitos granulocitos (12 a 15 μm de diámetro) y mononucleares. Los granulocitos o polimorfonucleares contienen gránulos citoplasmáticos que poseen diferente reacción frente a los colorantes. Otras células hemáticas son los neutrófilos (10-12 μm), eosinófilos (10-15 μm), basófilos (10-12 μm) y mononucleares constituidos por monocitos (12-20 μm) y linfocitos (8-12 μm).

Las pruebas de laboratorio en hematología son variadas destacando por ser rutinarias el hemograma completo, análisis que permite el recuento y verificación de los diferentes tipos de células que constituyen la sangre, manejados bajo parámetros clínicos internacionalmente homologados. El texto incluye temas básicos y aplicables que todo estudiante de laboratorio clínico debe conocer y dominar, desde la correcta toma de muestras basada en la ejecución correcta del procedimiento (principios generales para la venopunción). Los siguientes capítulos referencian al lector en el uso de anticoagulantes, frotis de sangre, manejo de analizadores hematológi-

cos automáticos o contadores hematológicos, coagulación, tipificación sanguínea, velocidad de sedimentación globular, recuento de reticulocitos, alteraciones cuantitativas-cualitativas de la fórmula leucocitaria con sus respectivas alteraciones nucleares y finalmente las alteraciones de la serie roja.

El diagnóstico hematológico se sustentará en dos pilares: a) el estudio clínico al paciente por el médico y b) la minuciosa observación microscópica de la sangre y de la médula ósea, que constituye el enfoque del libro.

Los autores

Capítulo 1

Principios generales para la venopunción

Elección de la zona para realizar la venopunción

La elección del sitio de punción es vital en el procedimiento. Existen diversos lugares que pueden ser elegidos para la venopunción; la zona más propicia es la fosa antecubital localizada entre el brazo y antebrazo en la cara ventral del miembro superior, lugar donde se localiza un gran número de venas superficiales. Las venas de esta zona tienen una distribución anatómica que puede variar de un individuo a otro, distinguiéndose dos tipos comunes: uno en forma de H dado por las venas cefálica, cubital mediana y basilíca (70% de casos) y otro en forma de M dada por la distribución de las venas más prominentes: cefálica, cefálica mediana, basilíca mediana y basilíca.

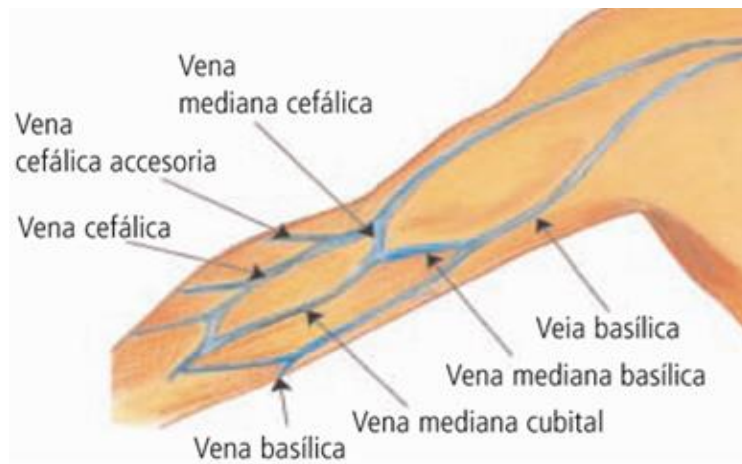


Figura 1. Venopunción. Localización de las venas del miembro superior.

Fuente:

http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/hematologia/ficheros/guia_del_lshh.pdf

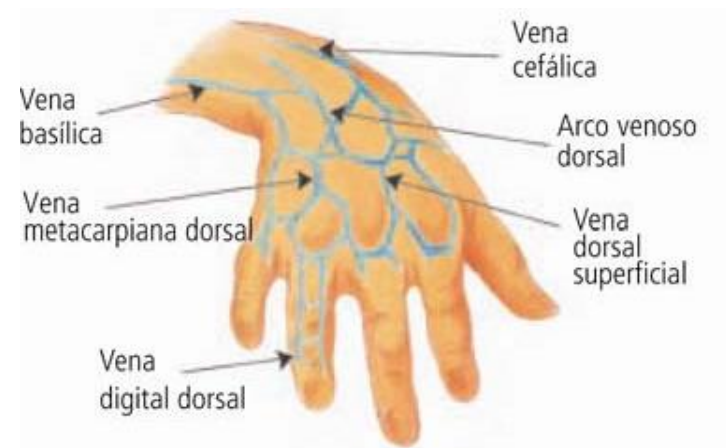


Figura 2. Venopunción. Localización de las venas del dorso de la mano.

Fuente:

http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/hematologia/ficheros/guia_del_lshh.pdf

Las venas cubital, mediana y cefálica son utilizadas con más frecuencia para el procedimiento de punción. La vena cefálica es más susceptible de presentar hematomas y tiene la mayor sensación dolorosa al punzarla. Cuando las venas de esta región no están dispo-

nibles o no son accesibles, las venas del dorso de la mano pueden ser usadas para la venopunción. Las venas localizadas en la parte distal del antebrazo, en la cara ventral no se recomienda puncionarlas por la proximidad de varias estructuras anatómicas como tendones y nervios que pueden ser lesionados accidentalmente durante el procedimiento.

El arco venoso dorsal de la mano y la vena dorsal del metacarpo son más usados para el procedimiento de punción por ser venas de mayor calibre. No deben ser puncionadas las venas de las extremidades inferiores, especialmente a nivel de los tobillos, por el alto riesgo de provocar flebitis, trombosis o necrosis tisular.

La punción arterial no debe considerarse una alternativa para punción, debido a la dificultad de la canalización y posibles complicaciones; si debe realizarse la punción será previa autorización médica.

Zonas donde debe evitarse la venopunción

De preferencia, las muestras de sangre deben extraerse de miembros en los que no se hayan colocado vías intravenosas.

Se recomienda evitar:

- Zonas que contengan grandes áreas de cicatrices por quemaduras.
- En caso de mastectomía, se debe consultar al médico antes de extraer sangre de zonas cercana a la misma, para evitar potenciales complicaciones derivadas de la linfostasis.
- La extracción de sangre en zonas con hematoma, puede dar resultados erróneos en las pruebas de laboratorio; si no existiera otra opción, la muestra se debe extraer distalmente al mismo.
- Áreas con fístulas arteriovenosas, injertos vasculares o cánulas vasculares; no deben ser manipuladas para extraer sangre por personal no autorizado.
- Evitar puncionar venas trombosadas por ser poco elásticas y tener paredes endurecidas.

Técnicas para localizar la vena

Antes de realizar la venopunción se informará al paciente sobre el procedimiento y las posibles complicaciones que se puedan presentar. Como metodología, se recomienda:

- Brindar confianza y seguridad al paciente, a través del diálogo.
- Observar cuidadosamente los dos brazos y las manos.
- Observar las venas para determinar aquella de mayor calibre, tomando una determinación sin que medie el criterio del paciente.
- Una vez tomada la decisión proceder con las siguientes observaciones:

Movimiento	<ul style="list-style-type: none"> Solicitar al paciente que abra y cierre la mano; los movimientos de apertura de las manos reducen la presión venosa y relajan los músculos.
Masajes	<ul style="list-style-type: none"> Masajear suavemente el brazo del paciente (del puño hacia el codo).
Palpación	<ul style="list-style-type: none"> Palpar con el dedo índice la superficie, esto ayuda a distinguir entre venas y arterias por la presencia de pulsaciones; no utilizar el dedo pulgar por la baja sensibilidad de la percepción a las pulsaciones. Fijar las venas con los dedos, en casos de flacidez.
Transiluminación	<ul style="list-style-type: none"> Procedimiento mediante el cual, la persona que extrae la sangre, utiliza una o dos fuentes primarias de luz, la primera de alta intensidad, la segunda LED. El equipo transiluminador cutáneo es de gran ayuda para localizar las venas, a través de haces luminosos. Fijar el torniquete con la técnica adecuada, deslizando el transiluminador por la piel, siempre adherido a la superficie para que la luz no se disperse. Las venas se verán como líneas oscuras. Una vez definida cuál es la mejor zona para la punción, el transiluminador se fija en la región escogida, evitando que obstruya el flujo sanguíneo. Introducir la aguja, completando el procedimiento como lo indica la técnica. El transiluminador se utiliza con buenos resultados en neonatos, niños, ancianos, obesos, personas hipotensas y pacientes en los cuales la localización de las venas es difícil.

Generalidades para la toma de la muestra

La toma de la muestra define al procedimiento que permite obtener tejido líquido o sólido, secreción o excreción de una persona, para su estudio en un laboratorio; cuando dicha obtención se efectúa con un método invasivo se denomina extracción. Es importante diferenciar entre espécimen y muestra. **Espécimen** es la parte del sistema biológico que se obtiene para estudio y la **muestra** es la parte del espécimen que debidamente tratada, se utiliza para analizar; en algunos casos espécimen y muestra coinciden, en otros no. Por ejemplo, para un hemograma el espécimen es sangre total y la muestra también; en cambio, para una prueba de coagulación, el espécimen es sangre total y la muestra es el plasma. Las muestras que se requieren para los estudios hematológicos son:

- Sangre venosa y capilar.
- Médula ósea.
- Líquido ceforraquídeo.

Extracción de sangre venosa

La sangre venosa constituye la muestra más importante por la riqueza de datos que aporta y su relativa facilidad para obtenerla. No es propósito del texto describir el procedimiento de venopunción, pero sí puntualizar varias recomendaciones sobre la técnica y establecer normas básicas orienten al profesional que realice el procedimiento.

Se sugiere realizar las extracciones sanguíneas con sistema de vacío, ya que aportan seguridad al profesional evitando exposición accidental por autoinoculación y dos de los errores preanalíticos frecuentes: a) hemólisis de las células y b) incorrecto llenado del tubo.

El profesional encargado deberá cumplir normas de bioseguridad estrictas y mantener la concentración durante todo el proceso.

Recomendaciones generales para la venopunción

- Identificar al paciente antes de realizar la extracción: verificar nombre, edad y motivo por el que se realiza los exámenes. De ser necesario pedir identificación. En caso que el paciente se encuentra inconsciente, preguntar al personal de enfermería o a los familiares.
- Identificar el pedido y las muestras con el mismo código de barras; se extremarán las precauciones en este paso porque un error en esta etapa es indetectable en la fase analítica.
- Colocar el torniquete entre 7 y 10 cm por encima del lugar elegido para la venopunción, soltarlo inmediatamente después de canalizar la vena. Nunca debe permanecer más de dos minutos ajustado, pues altera el equilibrio entre el líquido y los elementos formes de la sangre (aumenta 10% el valor del hematocrito y 15% el valor de la coagulación).
- Realizar una punción lo menos traumática posible, sobre todo si incluye estudio de coagulación; cuanto más limpia sea la punción menos factores tisulares se liberarán.
 - Evitar las causas de hemólisis de la muestra que son: a) uso de jeringuilla y aguja para la extracción, b) tirar con excesiva fuerza del émbolo, c) usar una llave de tres vías, d) forzar el paso de sangre por la aguja y e) llenar el tubo sin dejar deslizar la sangre por la pared interna del mismo.
- Homogeneizar inmediatamente después de retirar cada tubo, mediante el procedimiento de inversión (5 a 10 veces).
- Si se usa jeringuilla y aguja para realizar la extracción, hay que recordar:
 - No destapar tubos al vacío ya que al volver a cerrarlos, puede producirse un exceso de presión en el interior del tubo que provoca la brusca salida del tapón durante el transporte.
 - Respetar el volumen de llenado de cada tubo, y en especial el tubo para coagulación.
 - Llenar los tubos dejando resbalar la sangre por la cara interna de los mismos, no dejarla caer directamente al fondo, ni forzar el paso de la sangre por la aguja.
- Respetar el orden de extracción de los tubos, este variará en función del sistema utilizado para realizar la extracción.

Secuencia de los tubos plásticos para extracción de sangre

1. Frascos para hemocultivo.
2. Tubos con citrato (celeste).

3. Tubos para suero con activador de coágulo, con o sin gel separador (tapa roja o amarilla).
4. Tubos con heparina con o sin gel separador de plasma (tapa verde).
5. Tubos con EDTA
6. Tubos con fluoruro (tapa gris).

Secuencia de los tubos de vidrio para extracción de sangre

1. Frascos para hemocultivos.
2. Tubos para suero de vidrio siliconado (tapa roja).
3. Tubos con citrato (tapa azul claro).
4. Tubos para suero con activador de coágulo, con o sin gel separador (tapa amarilla).
5. Tubos con heparina con o sin gel separador de plasma (tapa verde).
6. Tubos con EDTA
7. Tubos con fluoruro (tapa gris).

Homogeneización para tubos de extracción de sangre

Es importante que, inmediatamente después de la extracción, todos los tubos sean homogeneizados; el procedimiento debe realizarse por inversión según se detalla:

- No se deben homogeneizar vigorosamente los tubos de citrato por el riesgo de activación plaquetaria e interferencia en las pruebas de coagulación.
- Si se utilizan tubos de citrato para extraer sangre al vacío con aspiración parcial, se observarse una falsa trombocitopenia. Este fenómeno puede ocurrir por activación plaquetaria ocasionada por el «espacio muerto» entre la sangre extraída y la tapa de estos tubos. Si falla la homogeneización de la sangre en el tubo con anticoagulante, se produce la formación de microcoágulos.

Tabla 1. Número de inversiones por tipo de tubo.

Grupo de anticoagulantes/aditivos	Número de inversiones
Tubos con gel separador	
Tubos con gel activador de coagulo	5 a 8 veces
Tubos con gel y heparina	8 a 10 veces
Tubos con aditivos	No es necesario homogeneizar
Tubos siliconados	
Tubos con aditivos para obtener suero	5 a 8 veces
Partículas activadoras de coágulo	
Tapa roja o amarilla	

Tubos con sangre total/plasma

EDTAK2 o EDTAK3	
Citrato (coagulación)	8 a 10 veces
Citrato (VHS)	5 a 8 veces
Fluoruro de sodio/EDTA Na2 (glucosa)	5 a 8 veces
Heparina	8 a 10 veces
Acido cítrico, citrato, dextrosa (ACD)	8 a 10 veces
	8 a 10 veces

Tubos con elemento de trazo

EDTA o heparina	8 a 10 veces
Con activador de coágulo para obtener suero	5 a 8 veces

Fuente:http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/hematologia/ficheros/guia_del_lshh.pdf

Tubos con activador del coágulo

Se usa para estudios en suero; este tipo de tubo no lleva anticoagulante, por el contrario su pared interna está recubierta con una sustancia activadora que facilita y acelera el proceso de retracción del coágulo. En el fondo del tubo existe un gel separador que al momento de centrifugar se interpone entre el suero y el coágulo, separándolos definitivamente e impidiendo su homogeneización posterior. Su volumen de llenado es 5 a 7 ml. Este tubo se utiliza preferentemente en el área de hematología biológica para el estudio de anemia y para algunas pruebas específicas del banco de sangre.

Obtención de la muestra de la sangre capilar

La punción de la piel se realiza con una aguja o con lanceta. El uso de agujas hipodérmicas o intravenosas es totalmente desaconsejado por ser causa de pinchazos accidentales. En adultos y niños mayores, se obtiene la muestra de sangre de la falange distal del tercer o cuarto dedos, en un sitio ubicado entre 3 a 5 mm del lecho ungueal.

Antiguamente se obtenía sangre capilar luego de puncionar el lóbulo auricular; actualmente su uso no se recomienda debido a que el flujo sanguíneo que se obtiene es tan reducido que no es representativo de la sangre circulante. El área plantar central y la curvatura posterior no deben puncionarse en lactantes pequeños, para evitar el riesgo de lesión y posible infección de los huesos del tarso subyacentes, sobre todo en los recién nacidos. En lactantes, se pueden obtener muestras satisfactorias mediante una punción profunda de la superficie plantar del talón, el cual debe tener una temperatura moderadamente elevada, siendo necesario, en ocasiones bañar al niño en agua caliente.



Figura 4. Lugares de punción.



Figura 5. Primera gota de sangre.

Fuente: http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/hematologia/ficheros/guia_del_lshh.pdf

Procedimiento a seguir para la recolección de la muestra de sangre capilar

- Limpiar el área con alcohol al 70% y dejar que seque.
- Se puncionará la piel hasta una profundidad de 2 a 3 mm, usando una lanceta estéril desechable.
- La primera gota de sangre que emana se retirará con una gasa estéril seca.
- Si es necesario, puede apretarse el área muy suavemente, para promover el flujo libre de sangre.
- Se recogerá la segunda y las siguientes gotas en una tira reactiva o con una micropipeta de 10 o 20 µl y se introducirá la muestra inmediatamente en el diluyente. Es necesario que exista un flujo de sangre libre y sólo es aceptable realizar una compresión muy suave; debe haber un flujo lento pero espontáneo de grandes gotas de sangre.
- Si se aprieta con fuerza para obtener sangre, los resultados no son fiables. Si la escasez de flujo se debe a que el sitio de punción está frío y cianótico; las cifras obtenidas de hemoglobina, recuento de hematíes y leucocitos son, por lo general, demasiado altas.

Extracción de sangre en situaciones especiales

- Evite extraer sangre del brazo donde exista una vía de perfusión ya que la muestra obtenida estará diluida. Si no hubiera otra opción por estar canalizados los dos brazos, cierre la perfusión y espere al menos dos minutos para realizar la extracción.
- La extracción de sangre de un catéter debe asegurar que la solución perfundida o el uso de heparina interfieran en el resultado del análisis. Siempre debe desecharse un equivalente en volumen a 2 o 3 veces el contenido de la luz del catéter; si la extracción es para un estudio de coagulación no debe usarse este método, a menos que se lo realice en el momento de la implantación de la vía.
- Se recomienda utilizar un adaptador de vacío para el llenado de los tubos.
- La obtención de sangre arterial para realizar estudios hematológicos no está aconsejada.

- Debe tenerse en cuenta que las jeringuillas de extracción arterial están heparinizadas, por lo que no pueden usarse para la estudios de coagulación.
- En la práctica diaria, pueden presentarse situaciones en las que no es posible usar otra opción que las descritas anteriormente, en estos casos, debe informarse al laboratorio las características de la extracción y de la imposibilidad de realizarla de otra forma.

Causas de resultados falsos por defectos en la recolección de la muestra

Antes de la recolección	<ul style="list-style-type: none">• Ingestión de agua o alimentos en las 2 horas anteriores a la recolección de la muestra u orinar 30 min antes de la toma de la misma.• Fumar.• Actividad física, incluyendo el caminar rápidamente, en los 20 minutos anteriores a la toma de la muestra.• Estrés.• Administración de fármacos o de suplementos dietéticos en las 8 horas anteriores a la recolección de la muestra.
Durante la recolección	<ul style="list-style-type: none">• Diferencias horarias, existe variación de los valores diurnos y nocturnos.• Postura del paciente en el momento de la recolección: acostado, de pie o sentado.• Hemoconcentración por mantenimiento prolongado de la presión del torniquete.• Exceso de presión negativa al aspirar la sangre en la jeringuilla.• Tipo de tubo incorrecto.• Sangre capilar en vez de sangre venosa.
Manejo de la muestra	<ul style="list-style-type: none">• Anticoagulante insuficiente o en exceso.• Mezcla inadecuada de la sangre con el anticoagulante.• Error en la identificación del paciente y/o muestra.• Condiciones inadecuadas de almacenamiento de la muestra.• Retraso en el transporte al laboratorio.

Variaciones fisiológicas en el recuento sanguíneo

El recuento eritrocitario (RE) y la concentración de hemoglobina (Hb) presentan variaciones considerables en diferentes períodos de la vida. Al nacimiento, el valor de la hemoglobina es mayor que en cualquier otro período posterior. El RE está elevado inmediatamente después del nacimiento y con frecuencia se registran valores más altos de Hb. Tras el período posnatal, la Hb cae abruptamente hasta alcanzar su valor mínimo alrededor del segundo mes. El RE y el hematocrito también caen, aunque de forma menos pronunciada y las células pueden volverse microcíticas si aparece una deficiencia de hierro. La Hb y el RE aumentan normalmente en la pubertad de

forma gradual hasta casi alcanzar los valores de los adultos.

Los valores en mujeres son significativamente menores comparado con los hombres. Aparte de la influencia hormonal en la hematopoyesis, es probable que la deficiencia de hierro sea otro factor que influya en esa diferencia; se desconoce en qué medida la menstruación se convierte en un elemento significativo, porque una pérdida de hasta 100 ml de sangre en cada período, puede producir una depleción de hierro a pesar de que no exista anemia. Existen periodos menstruales más cortos y con sangrado abundante que suelen ser controlados con anticonceptivos orales, ocasionando un aumento del hierro sérico sin que se afecten los valores de la hemoglobina.

Se registran diferencias étnicas en los niveles de hemoglobina; los afrodescendientes tienen 5 a 10 g/l menos que sus homólogos blancos en todas las edades e incluso 20 g/l en los 2 primeros años de vida.

Condiciones pre analíticas que podrían alterar los resultados

En la interpretación de los valores, no debe olvidarse ciertas condiciones patológicas preestablecidas del paciente como son:






- Hemorragias agudas que altera el valor correcto del hematocrito y contejes celulares por la hemoconcentración.
- Procedimientos intraoperatorios o durante el postoperatorio inmediato, principalmente cuando se transfundieron componentes sanguíneos, soluciones expansoras o simplemente soluciones hidratantes.
- Alteraciones lipídicas, disproteinemias o trastornos metabólicos podrían alterar la permeabilidad de las membranas celulares, siendo los recuentos obtenidos no confiables.

Obtención de la muestra

- El anticoagulante indicado es EDTA (tubo de tapa lila) con una relación anticoagulante/sangre 1:1.
- Se homogeniza la muestra con la inversión suave del tubo, evitando la agitación enérgica que podría generar hemolisis.
- El tiempo de recolección de la muestra debe ser mínimo, sobre todo cuando la muestra es obtenida mediante goteo o jeringuilla, en donde la sangre entra en contacto con las paredes y se activa las fases de la coagulación, lo que imposibilita finalmente la realización del análisis.

La muestra en lo posible, no debe ser tomada de una misma extremidad donde se encuentre una vía de administración terapéutica, pues resulta inevitable su mezcla y el resultado obtenido estará alterado.

Tabla 2. Tipos de tubos al vacío, color del tapón y activador de la coagulación.

TUBO VACUTAINER TAPON ROJO, SIN ADITIVO, CON ACTIVADOR DE COAGULACION				
	No. CAT.	ADITIVO	VOL. DE DRENADO	TAMAÑO DEL TUBO
	366668	S/ ACTIVAOR	3.0 ML.	13 X 17 mm.
	367812	ACTIVADOR DE COAGULACION	4.0 ML.	13 X 17 mm.
	368175	ACTIVADOR DE COAGULACION	6.0 ML.	13 X 100 mm.
	367820	ACTIVADOR DE COAGULACION	10.0 L.	16 X 100 mm.
TUBO VACUTAINER TAPON ORO CON GEL Y ACTIVADOR DE COAGULACION				
	No. CAT.	ADITIVO	VOL. DE DRENADO	TAMAÑO DEL TUBO
	367983	CON GEL Y ACTIVADOR DE COAGULACION	3.5 ML.	13 X 75 mm.
	368159	CON GEL Y ACTIVADOR DE COAGULACION	5.0 ML.	13 X 100 mm.
TUBO VACUTAINER TAPON AZUL CON CITRATO DE SODIO				
	No. CAT.	ADITIVO	VOL. DRENADO	TAMAÑO DEL TUBO
	363080	CON CITRATO DE SODIO	1.8 ML.	13 X 75 mm.
	369714	CON CITRATO DE SODIO	4.5 ML.	13 X 75 mm.
	363083	CON CITRATO DE SODIO	2.7 ML.	13 X 75 mm.
TUBO VACUTAINER TAPON LILA CON EDTA - K2				
	No. CAT.	ADITIVO	VOL. DRENADO	TAMAÑO DEL TUBO
	367856	CON EDTA - K2	3.0 ML.	13 X 75 mm.
	367844	CON EDTA - K2	4.0 ML.	13 X 75 mm.
	368171	CON EDTA - K2	4.0 ML.	13 X 75 mm.
	367863	CON EDTA - K2	6.0 ML.	13 X 100 mm.
TUBO VACUTAINER TAPON VERDE CON HEPARINA				
	No. CAT.	ADITIVO	VOL. DRENADO	TAMAÑO DEL TUBO
	366667	CON HEPARINA DE LITIO 51 USP	3.0 ML.	13 X 75 mm.
	367871	CON HEPARINA DE SODIO 68 USP	4.0 ML.	13 X 75 mm.
	367878	CON HEPARINA DE SODIO 86 USP	6.0 ML.	13 X 100 mm.
	367886	CON HEPARINA DE LITIO 87 USP USP	6.0 L.	13 X 100 mm.
	367962	CON HEPRINA DE LITIO Y GEL SEPARADOR	4.5 ML.	13 X 75 mm.

Capítulo 2

Anticoagulantes usados en hematología

Anticoagulante EDTA

El anticoagulante EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) o sal disódica, dipotásica o tripotásica del ácido etilendiaminotetraacético, actúa mediante un efecto quelante sobre el calcio (Ca^{++}), impidiendo el proceso de la coagulación al fijarlo. Este anticoagulante se utiliza fundamentalmente para recuentos celulares, sobre todo en autoanalizadores y permite además, realizar el hematocrito y frotis sanguíneo hasta dos horas después de extraída la muestra. Además, impide la aglutinación de plaquetas.

Las sales de potasio tienen ventaja sobre las de sodio, al ser más fácilmente solubles en sangre cuando se usa a partir del producto sólido, sin embargo, las tres sales afectan el tamaño del eritrocito, especialmente después del almacenamiento de la sangre anticoagulada por espacio de algunas horas.

Efectos del anticoagulante EDTA: el exceso de EDTA, independientemente de la sal utilizada, afecta tanto los hematíes y leucocitos, produciendo su encogimiento y la aparición de cambios degenerativos. El EDTA por sobre 2 mg/ml de sangre puede ocasionar una reducción significativa en el hematocrito por centrifugación y un aumento en la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). Las plaquetas también se ven afectadas; el exceso de EDTA provoca su edema y desintegración, lo que da lugar a un recuento plaquetario artificialmente elevado cuando los fragmentos suficientemente grandes son considerados como plaquetas normales. Por tanto, debe asegurarse de que la cantidad de sangre añadida sea la correcta y que gracias a inversiones repetidas del contenedor, el anticoagulante se mezcle completamente con la sangre.

Es posible que en las extensiones sanguíneas realizadas con EDTA no puedan observarse los punteados basófilos de los hematíes en casos de intoxicación por plomo. También se ha demostrado que el EDTA produce una leucoaglutinación, que afecta tanto a los neutrófilos y linfocitos siendo además responsable de la actividad de un autoanticuerpo antiplaquetario, el cual aparece de forma natural y puede en ocasiones, causar la adherencia de las plaquetas a los neutrófilos en las extensiones sanguíneas. Se ha observado que la activación de los monocitos, mediada por la liberación del factor tisular y por la actividad del factor de necrosis tumoral, es menor al usar como anticoagulante al EDTA comparado con el citrato y la heparina. De forma similar, altera la activación de los neutrófilos mediada por la liberación de la lactoferrina inducida por los lipopolisacáridos. Parece que el EDTA también suprime la degranulación plaquetaria.

Heparina sódica o de litio

La heparina sódica o de litio es un anticoagulante fisiológico que actúa al impedir que la protrombina se transforme en trombina. Estructuralmente es un mucopolisacárido ácido; los frotis realizados con muestras sanguíneas anticoaguladas con heparina, producen en las tinciones panópticas un color azulado y una pseudovaculización celular, por lo tanto no se lo recomienda para tal fin. La proporción adecuada es de 0,1 a 0,2 mg de heparina por ml de sangre.

Citrato trisódico

El citrato trisódico ($C_6H_5O_7Na_3$), impide que el calcio se ionice, interfiriendo la coagulación. Se utiliza para realizar las pruebas de hemostasia en una proporción sangre anticoagulante de 9:1; permite realizar la prueba de velocidad de eritrosedimentación con una proporción sangre anticoagulante de 4:1. El citrato sódico se utiliza a una concentración de 0,106 mol/l (31,3 g/l de $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$).

ACD (ácido citrato dextrosa)

El ACD se emplea fundamentalmente en bancos de sangre, con la finalidad de conservar las unidades de sangre y para estudios metabólicos eritrocitarios, por la buena conservación de los hematíes que permite. Se utiliza en una proporción de un volumen de ACD por cada cuatro volúmenes de sangre. La proporción de la mezcla del anticoagulante es de:

- Ácido cítrico 0,9 g.
- Citrato disódico 2 g.
- Dextrosa 2 g.
- H₂O destilada 120 ml.

Efectos de los anticoagulantes sobre el almacenamiento de sangre y recuento sanguíneo

Cuando se almacena sangre con anticoagulantes a temperatura ambiente se producen diversos cambios; estos varían dependiendo del anticoagulante empleado. Son menos marcados los cambios con ACD, CPD o solución de Alsever respecto a la sangre tratada con EDTA (mayor efecto con la sal tripotásica de EDTA comparado con la sal dipotásica). En relación con los efectos ambientales, son más rápidos cuanto más elevada es la temperatura ambiente.

Los recuentos de hematíes, leucocitos, plaquetas e índices eritrocitarios permanecen estables durante las 8 horas posteriores a la toma de la muestra de sangre; luego, los hematíes comienzan a modificarse, el hematocrito y el VCM se incrementan, aumenta la fragilidad osmótica y disminuye la VSG. Cuando la sangre se mantiene a 4°C, los efectos de los anticoagulantes sobre el recuento sanguíneo son generalmente insignificantes las primeras 24 horas. Para diversas determinaciones, se puede conservar la sangre de forma segura en el refrigerador, tomando precauciones que no se congele. Se advierte que es preferible realizar el recuento de leucocitos y sobre todo de plaquetas antes de transcurridas 2 horas de la toma de la muestra. La reducción en el recuento leucocitario y la reducción progresiva en el recuento linfocitario absoluto pueden ser notables luego de pocas horas, sobre todo si existe una cantidad

excesiva de EDTA ($> 4,5\text{mg/ml}$).

Un almacenamiento superior a 24 horas a 4°C produce datos falsos en los recuentos diferenciales automatizados de leucocitos, sin descontar que la magnitud de las variaciones depende también de las prestaciones del instrumento y de las recomendaciones del fabricante, que deben seguirse cuando se utiliza un método automático para este procedimiento.

Un estudio, en el que se utilizó un analizador de apertura-impedancia para el análisis de sangre dejada a temperatura ambiente, mostró que el recuento de leucocitos y neutrófilos permanecía estable durante 2 a 3 días, pero el resto de los leucocitos sólo permanecieron estables durante unas pocas horas.

Los recuentos de reticulocitos no se modifican cuando la sangre se mantiene con un anticoagulante ya sea EDTA o ACD, durante 24 horas a 4°C ; a temperatura ambiente el recuento comienza a disminuir a partir de las 6 horas. Los hematíes nucleados desaparecen de la muestra sanguínea de 1 a 2 días expuestos a temperatura ambiente.

La concentración de hemoglobina se mantiene sin cambios durante varios días, siempre y cuando, la muestra no sufra modificaciones en su presentación, relacionadas con la contaminación expresada a través del enturbiamiento o decoloración de la misma. Sin embargo, con 2 a 3 días de exposición a una temperatura ambiente alta, la sangre comienza a lisarse y produce disminución en los recuentos de hematíes y en el HCT, con un aumento de la HCM y de la CHCM.

La estabilidad de las pruebas de coagulación es fundamental para el diagnóstico y el tratamiento de las coagulopatías; estas pruebas deben efectuarse cabo a las 2 horas cuando la sangre o el plasma se han almacenado de 22°C a 24°C , máximo luego de 4 horas con un almacenamiento a 4°C , a las 2 semanas a -20°C y a los 6 meses a -70°C . Para las pruebas en plasma o suero, la sangre debe centrifugarse dentro de un plazo de 5 horas posteriores a la toma de la muestra.

Para análisis de vitamina B y folato, se debe mantener el suero o el plasma a 4°C o a -20°C si es necesario un almacenamiento superior a 2 ó 3 semanas. En el almacenamiento a largo plazo, debe dividirse la muestra en varias submuestras para evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

El manejo inapropiado de muestras sanguíneas durante el transporte al laboratorio, por ejemplo la agitación excesiva, puede causar hemólisis, coagulación parcial y desintegración celular. El envío de las muestras necesita un empaquetado especial.

Efectos del almacenamiento sobre la morfología de las células sanguíneas

Los cambios en la morfología de las células sanguíneas se producen fácilmente, incluso en el almacenamiento a corto plazo. Estos

cambios no son únicamente el resultado de la presencia de un determinado anticoagulante, ya que pueden ocurrir también en la sangre desfibrinada. Independientemente del anticoagulante usado, las extensiones hechas con sangre que ha permanecido durante menos de 1 hora a temperatura ambiente no se distinguen fácilmente de las realizadas a la posterior toma de la muestra de sangre. A las 3 horas puede comenzar a observarse cambios y a las 12 a 18 horas, estos cambios se muestran más acentuados. Existe afectación de algunos aunque no de todos los neutrófilos; sus núcleos pueden teñirse de forma más homogénea que en la sangre fresca, los lóbulos nucleares pueden separarse y el borde citoplasmático a veces se presenta deshilachado o menos definido y finalmente, aparecen pequeñas vacuolas en el citoplasma.

Los monocitos grandes, en muchos casos, desarrollan cambios notables; aparecen pequeñas vacuolas en el citoplasma y el núcleo sufre una lobulación irregular, que puede llegar casi a la desintegración.

Los linfocitos sufren cambios similares; en el citoplasma pueden observarse algunas vacuolas, los núcleos se tiñen de forma más homogénea de lo habitual y en algunos casos los núcleos sufren lobulación, dando lugar a núcleos con dos o tres lóbulos.

Los hematíes normales resultan ligeramente afectados al permanecer expuestos hasta por 6 horas a una temperatura ambiente. Los períodos superiores producen una progresiva espiculación (crenación) y formación de esferocitos.

El exceso de EDTA origina un grado notable de espiculación a las pocas horas. Todos los cambios previamente mencionados están retardados, aunque no abolidos si la sangre se mantiene a 4°C. Su aparición subraya la importancia de hacer las extensiones tan pronto como sea posible tras la toma de la muestra de sangre. No obstante, como norma, es aceptable un retraso de hasta de 3 horas.

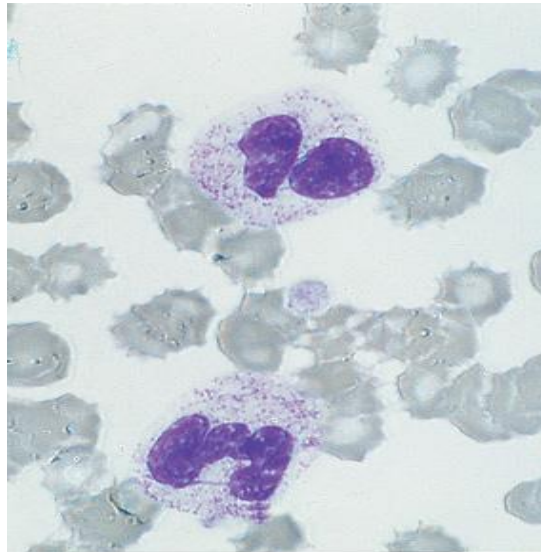


Figura 1. Polimorfo nuclear a las 24 horas de obtenida la muestra, anticoagulada con EDTA.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología Práctica. 2008

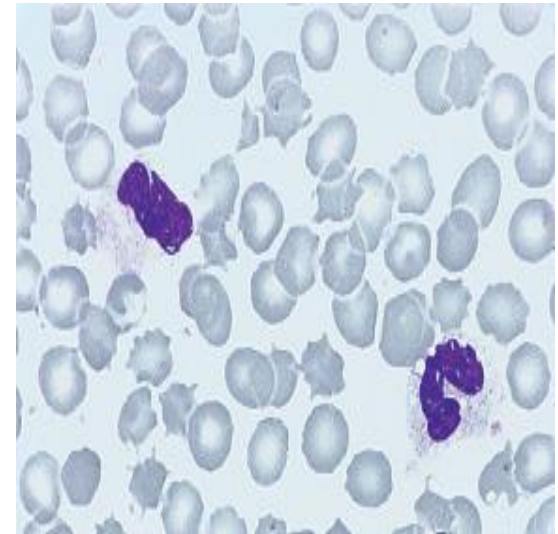
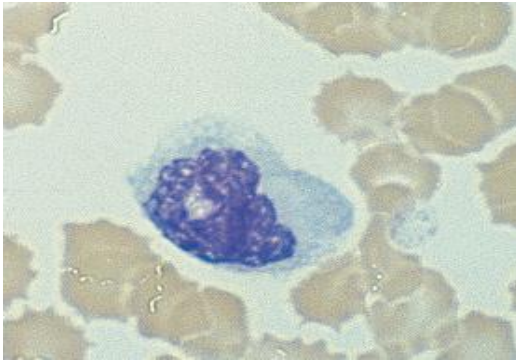
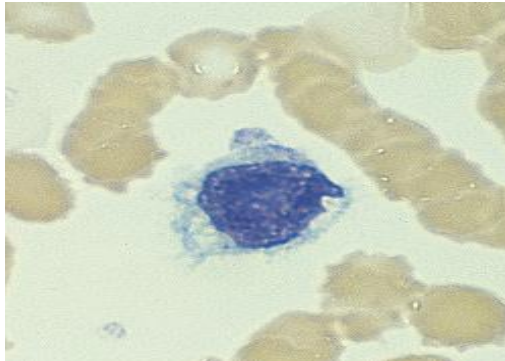


Figura 2. Células vistas a las 24 horas de obtenida la muestra anticoagulada con EDTA, mantenida a 20°C.

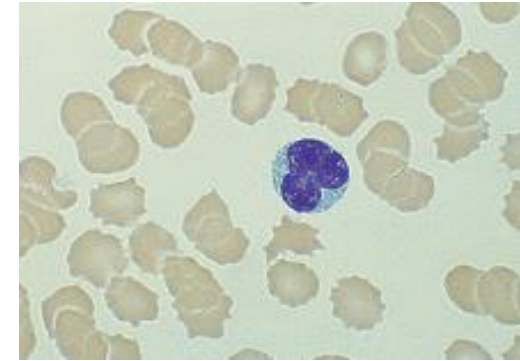
Fuente: Dacie y Lewis. Hematología Práctica. 2008

**Figura 3. Monocito**

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología Práctica. 2008

**Figura 4. Linfocito.**

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología Práctica. 2008

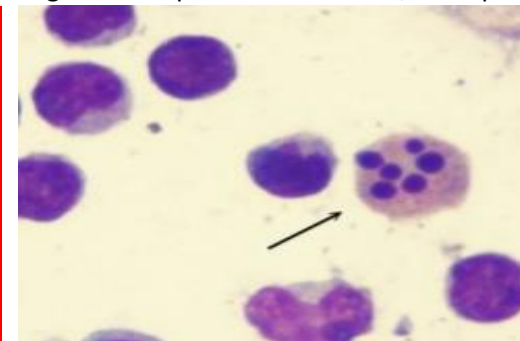
**Figura 5. Hematíes crenados.**

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología Práctica. 2008

Estas modificaciones producidas por la aparición de artefactos deben distinguirse de la apoptosis (proceso controlado de muerte celular programada) que se produce cuando las citocinas y los factores de crecimiento que regulan la supervivencia celular, se depletan o inhiben, siendo la disfunción mitocondrial el evento clave.

La apoptosis se caracteriza morfológicamente por encogimiento celular, con condensación citoplasmática alrededor de la membrana nuclear e indentaciones en el núcleo, seguido de su fragmentación; por último, los restos celulares forman unas masas basófilas extensas (los cuerpos apoptóticos).

Los neutrófilos en apoptosis, con un único cuerpo apoptótico pueden confundirse con hematíes nucleados, si no se valoran las características citoplasmáticas. Los restos celulares se eliminan de la circulación por fagocitosis y habitualmente, en las extensiones sólo se observa una célula apoptótica ocasional rodeada de células normales. Las células apoptóticas pueden verse con mayor frecuencia en las leucemias.

**Figura 6. Células en apoptosis**

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología Práctica. 2008

Capítulo 3

Frotis de sangre

Preparación de la extensión sanguínea

La extensión sanguínea debe realizarse inmediatamente después de la toma de la muestra de sangre; en ocasiones, las muestras sanguíneas son enviadas al laboratorio con un retraso variable. Existen ventajas al preparar las extensiones sanguíneas cuando se lleva a cabo la flebotomía. La bandeja de flebotomía puede incluir algunos portaobjetos y cubreobjetos de cristal limpios. Con un entrenamiento básico, los flebotomistas adquieren la formación adecuada para preparar la extensión. Se dispone de un dispositivo automático para la realización de la extensión.

Cuando las extensiones no se hacen al momento de la punción, deben realizarse en el laboratorio sin demora, tan pronto como se reciban las muestras. Sobre un portaobjetos perfectamente limpio, se coloca en un extremo una gota pequeña de sangre recién obtenida, sea de una punción digital, del talón (pediatría) o la última gota que se encuentra en la luz de la aguja cuando se extrae con jeringuilla. Es recomendable evitar usar sangre con anticoagulantes porque altera la morfología de las células.

Con otro portaobjetos de borde pulido y eliminados los ángulos, se realiza la extensión de la gota de sangre. Se conserva un ángulo menor a 45° respecto al portaobjetos horizontal; el portaobjetos extensor se apoya delante de la gota de sangre retrocediendo hasta tocarla, una vez que la misma se extiende a lo largo del borde de contacto por capilaridad, se avanza con firmeza y lentitud. Así se obtiene una fina película de sangre que representa a la gota de sangre que se extiende (Figura 1). Es necesario secar rápidamente el extendido al aire para evitar el deterioro de las células.

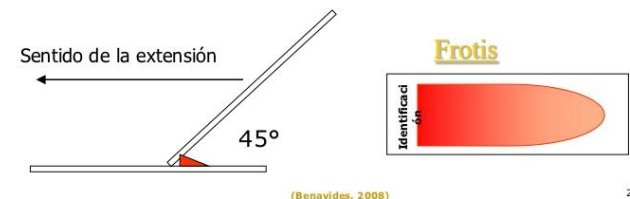


Figura 1. Técnica de extendido.

Fuente: es.slideshare.net

Un extendido obtenido con este procedimiento poseerá tres áreas de diferente espesor y con una distribución distinta de leucocitos por cada una de ellas (Figura 2).

1. Zona excesivamente gruesa: se encuentra en la región inmediata al punto de partida de la extensión (cabeza). En ella existe siempre un mayor número de linfocitos.
2. Zona excesivamente fina: corresponde al final de la extensión (cola) y en ésta se observa un exceso de granulocitos y monocitos.
3. Zona ideal: región central (cuerpo), donde existe un reparto equilibrado de las células.



Figura 2. Partes de extendido.

Fuente: 946986126. Guía 2012 trabajo práctico Hematología.
Para la lectura del extendido se debe realizar

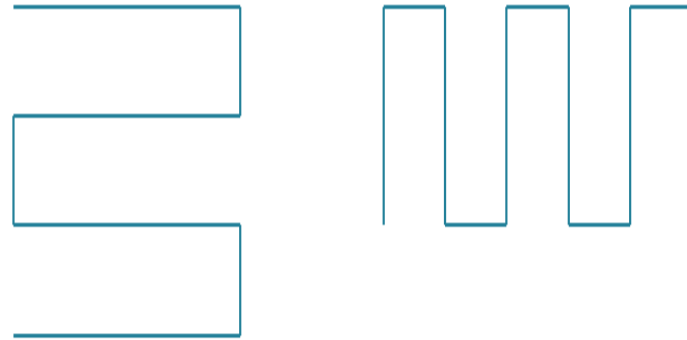


Figura 3. Formas de recorrer el preparado.

Fuente: 946986126. Guía 2012 trabajo

Para que un frotis sea válido:

- No debe ser demasiado grueso, los elementos estarán retenidos, apelotonados y no podrán ser identificados.
- No debe ser demasiado delgado, esto provoca que sea muy pobre en elementos, lo que impedirá una lectura conveniente.
- No debe alcanzar los bordes ni las extremidades del portaobjeto, se perderán los elementos más voluminosos. La gota debe agotarse sobre el portaobjetos.
- No debe presentar agujeros, ni estrías o flecos; los agujeros son provocados por la utilización de portaobjetos mal lavado con retención de grasa. Los extendidos en flecos son provocados por un extensor de bordes no esmerilados e irregulares. Conviene elegir el extensor observando sus bordes en el microscopio para asegurarse de que sean adecuadamente lisos.
- Realizar en forma regular la distribución de la sangre sobre el portaobjetos, para que los elementos se muestren heterogéneos y el recuento no varíe según los campos examinados.
- Secar correctamente; un secado defectuoso produce artefactos como pueden ser hematíes festoneados y otros.

Aspectos básicos a tomarse en cuenta en un frotis sanguíneo

- El tamaño de la gota debe ser el adecuado, para poder lograr un análisis efectivo; la habilidad para lograr el tamaño ideal se perfeccionará con la práctica.
- Si se ubicó una gota demasiado grande y se considera tiene un exceso de sangre, limpiar el portaobjeto con gasa o algodón. Repetir el procedimiento las veces que sean necesarias, hasta que la cantidad de sangre sea la adecuada.

- Si tuvieran que elegir entre un extendido largo y uno corto, es preferible el segundo, pero lo ideal es que ocupe tres cuartas partes de la lámina.
- Se recomienda el frotis delgado, cuidando de que no sea excesivamente fino por presentar inconvenientes: los hematíes aparecen poligonales con su claridad central desaparecida, las plaquetas se destruyen y los leucocitos resultan rotos o distorsionados.
- Nunca debe llevarse la gota de sangre por delante del extensor porque produciría erosión de las células.
- Un buen extendido luce como una “pincelada sobre vidrio”.
- Aunque el frotis sea ideal y el reparto homogéneo, no se puede evitar una cierta segregación de los elementos. Los linfocitos más pequeños predominan en el centro de la extensión. Los polimorfonucleares y los monocitos son atraídos hacia los bordes y cola.

Importante

- Lave y seque el extensor entre una y otra extensión.
- Los portaobjetos nuevos deben ser desengrasados con agua jabonosa y luego enjuagados minuciosamente.
- En frotis arrastrados todos los elementos que están en la cola deben rechazarse para la fórmula.

Coloración del frotis sanguíneo según el método May Grünwald-Giemsa

Fundamento: usualmente todos los métodos destinados a teñir las células de la sangre, se basan en el empleo de una mezcla de eosina y azul de metileno. Estos colorantes son sensibles a variaciones de pH de las diferentes estructuras celulares, de modo que las que tienen carácter básico fijan en mayor medida la eosina (colorante ácido) mientras que las que poseen propiedades ácidas fijan principalmente el azul de metileno (colorante básico). Esto explica el porqué ciertas estructuras basófilas presentes en el núcleo (nucléolo) o en el citoplasma (ribosomas) se colorean de azul, mientras que otros componentes acidófilos como la hemoglobina adquieren un color rosado.

De esta manera, las diferentes afinidades de ciertas granulaciones citoplasmáticas por dichos colorantes, permite clasificar los leucocitos polimorfonucleares en:

- **Neutrófilos:** la granulación específica posee compuestos neutros que fijan ambos colorantes simultáneamente, resultando un color pardo.
- **Eosinófilos:** la granulación específica contiene sustancias de intenso carácter básico que fijan fundamentalmente los colorantes ácidos, dando un color rojo-naranja.
- **Basófilos:** la granulación específica posee sustancias de carácter ácido, que fijan colorantes básicos dando un color azul oscuro.

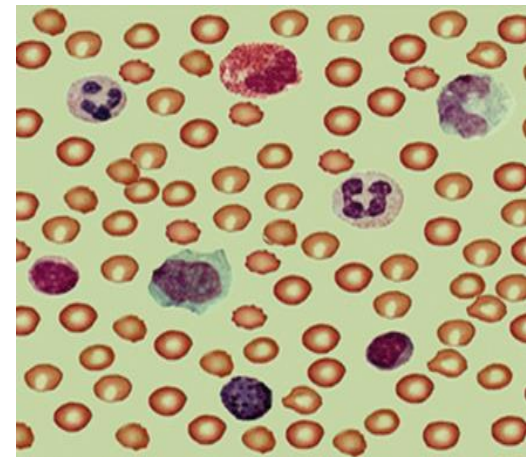


Figura 4. Elementos formes de la sangre.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología Práctica. 2008

Reactivos	<ul style="list-style-type: none">• Solución May Grünwald: eosinato de azul de metileno en metanol.• Solución Giemsa: azul de metileno (clorhidrato de tetrametiltionina); su derivado oxidado en medio alcalino (azul II) y eosina (tetrabromofluoresceína).
Método	<ul style="list-style-type: none">• Cubrir el frotis seco de sangre con solución May Grünwald. Dejar 3 minutos.• Agregar buffer fosfato pH 6,8 o una mezcla de agua de la llave con agua destilada en partes iguales, en proporción igual a la del colorante.• Homogeneizar soplando suavemente con una pipeta o moviendo el portaobjetos con un movimiento de vaivén.• Dejar 3 a 5 minutos. Volcar, enjuagar bajo chorro de la llave suave y cubrir el preparado con una solución de Giemsa, obtenida a razón de dos gotas del colorante por ml de agua (1/10).• Dejar 10 a 12 minutos. Lavar con agua, limpiar la cara inferior del portaobjeto con un algodón y secar al aire.

Fórmula leucocitaria

Contar por lo menos 100 leucocitos anotando la cantidad de cada uno de ellos para establecer los porcentajes; se referirá el valor de recuento de glóbulos blancos para cada tipo de leucocitos en valores absolutos por mm³ de sangre. El recuento de 100 elementos resulta relativamente sencillo en pacientes con valores absolutos de GB dentro de los valores de referencia. En el caso de pacientes leucopénicos con recuento bajo en una relación de 1500 GB/mm³, resultará muy difícil llegar a encontrar 100 elementos para poder expresar el porcentaje por lo que es aconsejable expresar literalmente lo que se observó en el preparado. Si en un recuento de un frotis en un paciente leucopénico se logró contar 80 elementos (puede ser 70 o 90 elementos dependiendo del tiempo utilizado y del grado de leucopenia del paciente) lo aconsejable es expresar los resultados de la siguiente manera: de 80 elementos contados, tantos son neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, etc. Es decir, se expresa cuantos elementos de cada serie se observó en el total de glóbulos blancos contados y no en porcentaje.

Los valores de los neutrófilos en personas de raza negra son ligeramente menores. No existe variación de la fórmula leucocitaria según el sexo, pero sí según la edad.

- Nacimiento: 70% de neutrófilos.
- Primera semana: 50% de neutrófilos y 50% de linfocitos.
- Segunda semana: 65% de linfocitos y 25% de neutrófilos
- 3 a 4 años: 50% de linfocitos y 50% de neutrófilos.
- 10 a 12 años: valores de referencia del adulto.

Descripción de cada uno de los elementos que componen una fórmula normal

Neutrófilo: tamaño de 9 a 15 μ m de diámetro. Núcleo lobulado (2 a 5 lóbulos). Los lóbulos están unidos entre sí por filamentos cromá-

tínicos muy delgados. La cromatina es condensada. Es una célula terminal. Mide aproximadamente 12µm. El citoplasma es abundante y rosado, cubierto por una granulación fina específica de color pardo rojo rosado.

Neutrófilos en cayado: tamaño de 9 a 15µm de diámetro, sólo se diferencia del anterior por su núcleo no lobulado en forma de C y a veces en forma de S. No existe una zona muy delgada de material nuclear que permita diferenciar dos lóbulos.

Eosinófilo: mide aproximadamente 13 µm. El núcleo no tiene más de 2 a 3 lóbulos, con predominio del bisegmentado en forma de anteojo. El citoplasma es abundante y está cubierto de granulaciones esféricas de mayor tamaño que las observadas en el neutrófilo. Se colorean de anaranjado.

Basófilos: mide aproximadamente 10 µm. El núcleo está irregularmente lobulado, la cromatina es densa, la masa nuclear es voluminosa con relación al citoplasma. Las granulaciones son groseras e irregulares en forma y tamaño, pudiendo quedar superpuestas al núcleo, cubriéndolo parcialmente.

Linfocitos: célula generalmente pequeña de 7 µm pero puede llegar hasta 12µ. La forma más pequeña posee sólo un escaso anillo de citoplasma color celeste. Alrededor de un 10% de los linfocitos circulantes son células más grandes y con citoplasma más abundante. El núcleo por lo general es redondo, pero puede tener una escotadura. La cromatina es densa.

Monocito: es el leucocito normal de mayor tamaño 12 a 20 µm, con un promedio de 18 µm de diámetro. El núcleo presenta forma irregular y variada, la cromatina es esponjosa. La proporción núcleo-citoplasma es aproximadamente igual; el citoplasma se tiñe de celeste plumizo y no presenta granulaciones.

Tabla 1. Valores de referencia glóbulos blancos en adultos sanos.

Células	Valor relativo (%)	Valor absoluto (x10 ⁹ /l)
Cayados	0-2	0-0,2
Neutrófilos segmentados	50-70	23-6,5
Eosinófilos	1-4	0.05-0,45
Basófilos	0 - 1	0-0,1
Linfocitos	20-40	1,5-4,0
Monocitos	3 - 8	0,1-0,8

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008

Hematocrito (HCT)

El hematocrito (HCT) es la relación existente entre el volumen de eritrocitos y el volumen total de sangre, expresado como porcentaje. Está directamente relacionado con la concentración de hemoglobina, por lo que su determinación constituye el procedimiento más simple para el diagnóstico de anemia. Así, un descenso del hematocrito es indicativo de anemia, mientras que el aumento lo es de poliglobulia. El método de referencia para la determinación del HCT es la centrifugación de sangre total en tubo capilar (micrométodo); como técnica es sencilla, barata y accesible a laboratorios de baja complejidad. Puede emplearse un tubo de Wintrobe (macromé-

todo), este procedimiento no es tan recomendable debido a su mayor inexactitud e imprecisión. Ambos métodos se basan en medir el empaquetamiento de la columna de eritrocitos, cuando la sangre total con anticoagulante se somete a la acción de una fuerza centrífuga. Por ello, entre sus factores de error está el plasma que queda atrapado entre los eritrocitos empaquetados y el posible efecto de leucocitos y plaquetas en la lectura.

En la actualidad, todos los autoanalizadores hematológicos suministran, dentro del contexto del hemograma automatizado, un valor de HCT que resulta de un cálculo electrónico a partir del Volumen Corpuscular Medio (obtenido por conductividad o campo oscuro) y la concentración de eritrocitos. Obviamente, este valor obtenido electrónicamente difiere del obtenido por centrifugación, en que no considera el efecto del plasma atrapado entre los eritrocitos, ni el efecto de las restantes células sanguíneas, por lo que es siempre algo inferior (0,2-0,3 %).

Tanto el HCT por microcentrifugación o por métodos automatizados, son un buen parámetro del estado de la serie eritroide. El HCT refleja la concentración y no la masa total de glóbulos rojos. Por ejemplo, en un paciente en estado de choque acompañado de hemoconcentración, el HCT puede ser normal o alto, aun cuando la masa eritrocitaria total esté disminuida por la pérdida de sangre. Por lo tanto, no es confiable como indicador de anemia después de una hemorragia o una transfusión.

Determinación del hematocrito: el método automático de determinación del hematocrito se basa en el cálculo matemático a partir del Volumen Corpuscular Medio (VCM) y el número de hematíes ($HCT = n \text{ de hematíes} \times VCM$)

Valores de referencia: el valor de HCT varía con la edad y el sexo. Se indican los valores medios ± 2 DE (ver tabla 2).

Tabla 2. Valores de referencia HCT.

Edad y sexo	Hematocrito %	Fracción
Recién nacidos	54 ± 10	$0,54 \pm 0,1$
Niños (hasta 10 años)	38 ± 5	$0,38 \pm 0,05$
Mujeres (18-50 años)	42 ± 5	$0,42 \pm 0,05$
Embarazadas	39 ± 5	$0,39 \pm 0,05$
Hombres (18-50 años)	45 ± 5	$0,45 \pm 0,05$

Fuente: 946986126. Guía 2012 trabajo práctico Hematología.

Micrométodo (microhematocrito): técnica muy utilizada por necesitar poca cantidad de sangre, es sencilla y simultáneamente se procesan numerosas muestras en poco tiempo. Utiliza tubos capilares de vidrio de 7 a 7,5 cm de longitud por 1 mm de diámetro interno. Algunos son heparinizados y otros no, dependiendo del tipo de muestra (sangre entera anticoagulada o sangre capilar). Si se

utiliza sangre capilar, se desechará la primera gota después de la punción.

- Llenar el tubo capilar hasta que se complete tres cuartas partes de su capacidad con sangre (aproximadamente 50 μ l). El llenado de los tubos se realiza por capilaridad, favoreciendo el proceso inclinando el capilar hacia abajo a medida que se va llenando.
- Limpiar con papel o gasa el capilar y tapar el extremo limpio con plastilina. Una vez cerrados se colocan los capilares en la centrífuga con el extremo del capilar cerrado hacia fuera y de modo que quede perfectamente equilibrada. Se centrifugan durante cinco minutos a 12.000 rpm. Tan pronto se detiene la centrífuga se extraen los capilares y se procede a su lectura. Esta se puede realizar con los lectores de hematocrito, que nos darán el resultado directamente o con una regla milimetrada, aplicando la siguiente regla de tres:

A: longitud total de sangre en el capilar.	100
B: longitud de la parte corpuscular	X hematocrito (por ciento).

Como calcular: $B \times 100/A$

La determinación del HCT debe realizarse por duplicado y la diferencia entre los dos valores obtenidos, no será superior a 0,01.

Causas de error: usualmente ocurren fugas de la muestra al no quedar bien sellado el capilar y generan un valor erróneo al perderse mayor proporción de células que de plasma. Se señalan otras circunstancias que deben ser consideradas:

- El uso de anticoagulantes líquidos provoca un error por dilución de la muestra.
- En muestras capilares, no descartar la primera gota produce una mezcla con los líquidos tisulares que provoca hemodilución.
- En muestras de sangre venosa, el lazo colocado durante un cierto tiempo produce hemoconcentración.
- La lectura no inmediata de los capilares, provoca que el sedimento de hematíes vaya tomando forma de bisel, si el capilar permanece en posición horizontal.

Estructura y síntesis de la hemoglobina

La hemoglobina es una molécula esférica de 64.500 D y ocupa el 33% del hematíe. Es una proteína conjugada tetramérica conformada por 4 subunidades, cada subunidad contiene un grupo Hem + un polipéptido llamado "globina". La hemoglobina (Hb) es la sustancia que da vida a cada glóbulo rojo y es el componente que transporta el oxígeno en el glóbulo rojo. El hematíe o glóbulo rojo es un saco lleno de líquido conocido como hemoglobina. Cada célula del cuerpo humano depende de la oxigenación para su crecimiento y función; este proceso está íntimamente controlado por la hemoglobina.

Durante 4 meses (120 días), los eritrocitos con un contenido normal de hemoglobina se someten a los rigores de la circulación. Los glóbulos rojos son estirados, retorcidos golpeados y apretados a medida que van circulando a través de la corriente sanguínea.

Estructura: la molécula de hemoglobina consta de dos estructuras primarias: la **porción hemo** que en su estructura consta de cuatro átomos en estado ferroso (Fe^{2+}), rodeados por protoporfirina IX o anillo de porfirina, una estructura formada en los glóbulos rojos nucleados. La protoporfirina IX es el producto final en la síntesis de la molécula hemo que resulta de una interacción de la succinil coenzima A y el ácido δ -aminolevulínico en la mitocondria de los glóbulos rojos nucleados.

Varios productos intermedios son formados, incluyendo el porfobilinógeno, el uroporfirinógeno y la coproporfirina. Cuando el hierro es incorporado, este se combina con la protoporfirina para formar la molécula hemo completa. Defectos de cualquiera de estos productos intermediarios pueden perjudicar la función de la hemoglobina.

La **porción de globina** consta de aminoácidos unidos entre sí para formar una cadena polipeptídica, un brazalete de aminoácidos. Las cadenas más predominantes para la hemoglobina del adulto son las cadenas α y β . Las cadenas α tienen 141 aminoácidos en una disposición única y las cadenas β tienen 146 aminoácidos en una disposición única. Las porciones hemo y globina de la molécula en la hemoglobina están unidas entre sí por enlaces químicos.

El 2,3 difosfoglicerato (2,3-DPG) es una sustancia producida por vía de la ruta de Embden Meyerhof durante la glicólisis anaeróbica. Está íntimamente relacionada con la afinidad de la Hb por el oxígeno.

Cada molécula de hemoglobina consta de cuatro grupos hemo con hierro en el centro y dos pares de cadenas de globina. La hemoglobina comienza a ser sintetizada en la etapa de normoblasto policromático (fase del desarrollo de los glóbulos rojos). Esta síntesis es visualizada por el cambio en el color citoplasmático, desde un azul profundo a un color citoplásmico de matiz lavanda.

De toda la hemoglobina, el 65 % es sintetizada antes de que el núcleo del glóbulo rojo sea extruido, el 35 % adicional sintetizado en la fase de reticulocito. Los glóbulos rojos maduros normales tienen un complemento lleno de hemoglobina, el cual ocupa poco menos de la mitad del área superficial del mismo.

Genética y formación de la cadena de hemoglobina: tres tipos de hemoglobina son sintetizados: hemoglobina embrionaria, hemoglobina fetal y hemoglobina de adulto. Cada uno de estos tipos de hemoglobina tiene un arreglo específico de las cadenas de globina y cada cadena de globina es controlada por un cromosoma específico. El cromosoma 11 contiene los genes para la producción de las cadenas épsilon (ϵ), beta (β), gamma (γ) y delta (δ). Cada progenitor contribuye con un gen para la producción de cada una de estas cadenas. Toda persona tiene dos genes para la producción de cualquiera de estas cadenas, uno procede de la madre y el otro del padre.

El cromosoma 16 es responsable por los genes alfa (α) y zeta (θ). Existen dos genes en el cromosoma para la producción de las cadenas alfa y un gen para la producción de las cadenas zeta, por lo que, cada progenitor contribuye con dos genes para la producción de las cadenas alfa y un gen para la producción de las cadenas zeta. Por lo anterior, toda persona tiene cuatro genes para la producción de las cadenas alfa (dos de cada progenitor) y dos para las cadenas zeta (uno de cada progenitor).

Las cadenas alfa son un componente constante de cada una de las hemoglobinas del adulto (Hb A, HbA₂, HbF), cada hemoglobina tiene obligatoriamente dos cadenas alfa como parte de su configuración química. Las cadenas épsilon y zeta están reservadas para la producción de la hemoglobina embrionaria; cuando el embrión se desarrolla, la Hb gower I formada por las cadenas (α_2, ϵ_2) y la Hb de Portland (γ_2, ζ_2) son sintetizadas y permanecen en el embrión por tres meses. Estas hemoglobinas no participan en la entrega del oxígeno.

La Hb F (α_2, γ_2) hemoglobina fetal, comienza a ser sintetizada aproximadamente al tercer mes del desarrollo fetal y permanece como la principal hemoglobina al momento del nacimiento. La cantidad de cadenas gamma descende y la cantidad de cadenas beta se incrementa entre los meses 3 a 6 después del parto, haciendo la Hb A (α_2, β_2) sea la principal hemoglobina del adulto (95% a 98%). La Hb A₂ (α_2, δ_2) le corresponde entre el 3% a 5% y la Hb F menos del 1%, siendo también parte del complemento de la hemoglobina normal del adulto.

La posición única de los aminoácidos en cada cadena y la especificidad de los mismos, son esenciales para la función normal de la molécula de hemoglobina. Anomalías en la síntesis o en la estructura de las cadenas proteicas pueden conducir a defectos de la hemoglobina.

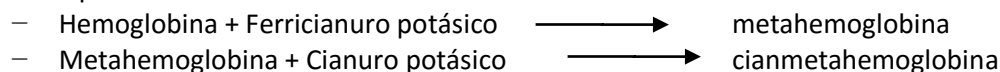
Función de la hemoglobina: el transporte de oxígeno es el principal propósito de la molécula de hemoglobina. Adicionalmente, la hemoglobina es una estructura capaz de sacar el CO₂ de los tejidos y mantener la sangre en un pH balanceado. La molécula de hemoglobina carga el oxígeno en una base de uno a uno (una molécula de oxígeno en una molécula de hemo) obtenido en el ambiente rico en oxígeno a nivel de los alvéolos pulmonares. La hemoglobina se torna saturada con oxígeno, formando la oxihemoglobina y tiene una alta afinidad por el oxígeno en este ambiente pulmonar. El trabajo de los capilares en los pulmones, es la difusión del oxígeno en un proceso rápido. Cuando la molécula de oxihemoglobina transita a través de la circulación, transporta el oxígeno descargándolo a los tejidos en áreas de baja afinidad por el oxígeno. Cuando la hemoglobina va a través del proceso de carga y descarga, aparecen cambios en la molécula.

Estos son cambios alostéricos; el término se relaciona con la forma en que la hemoglobina es capaz de rotar sobre su eje, determina la acción de los puentes de sal entre las estructuras de globinas y dicta el movimiento de 2,3-DPG. La molécula de hemoglobina aparece en una forma tensa y relajada. Cuando está tensa, la hemoglobina no está oxigenada, el 2,3-DPG se sitúa en el centro de la molécula y

los puentes de sal entre las cadenas de globina están en su sitio. Cuando está oxigenada toma la forma relajada, el 2,3-DPG es expulsado, los puentes de sal se rompen y la molécula es capaz de cargar totalmente el oxígeno.

Determinación de hemoglobina: método de la cianmetahemoglobina

Fundamento: este método se fundamenta en la transformación previa de la hemoglobina en cianmetahemoglobina (HiCN), que es muy estable y posee un color característico, con una absorbancia a 540 nm que puede ser cuantificada comparándola con soluciones de concentraciones previamente conocidas de hemoglobina y preparadas a partir del patrón de referencia (curva de calibración). Los distintos compuestos de hemoglobina, excepto la sulfohemoglobina que casi nunca es significativa, se transforman en HiCN según el siguiente proceso:



Materiales

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro: estos instrumentos deben ser calibrados periódicamente mediante la solución patrón de HiCN, preparada de acuerdo a las especificaciones del International Committee for Standardization in Haematology (ICSH)
- Tubos: 12 x 100 mm.
- Sangre venosa total anticoagulada con EDTA-K3 (1,5 mg/ml) o con heparina (10 UI/ml). Puede emplearse sangre capilar.
- Pipetas volumétricas de vidrio y de 5 ml.
- Pipetas automáticas de 20 µl, debidamente calibradas.
- Reactivo de cianmetahemoglobina (reactivo de Drabkin).
- Composición (pH 7-7,4).
- El detergente no iónico facilita la solubilización de proteínas insolubles y acelera la transformación de la hemoglobina en HiCN, de forma que aquella se completa en 5 minutos. Este reactivo debe tener un color amarillo pálido, ser completamente transparente y tener un pH entre 7 y 7,4. La lectura de absorbancia a 540 nm utilizando agua destilada como blanco debe ser igual a cero. Para su conservación utilizar botellas de vidrio de borosilicato (opacas) y mantener a temperatura ambiente (el frío modifica el color del reactivo).
- Patrón de referencia (solución comercial): es una solución de HiCN cuya absorbancia corresponde a una determinada concentración de hemoglobina. Todo patrón de referencia de HiCN debe cumplir las especificaciones del llamado patrón primario de HiCN (detalladas en el punto siguiente).
- Patrón primario de HiCN: se suministra a centros o personas relacionadas con programas oficiales reconocidos para la estandarización y el control de calidad. Este patrón, es una solución muy estable de cianmetahemoglobina cuyas propiedades y características fisicoquímicas han sido definidas por el ICSH en base al

	<p>peso molecular (64,458) y el coeficiente de extinción (44,0) de la hemoglobina. Se suministra en ampollas cerradas al vacío que contienen 10 ml de una solución de HiCN, correspondiente a una concentración exacta de hemoglobina que se indica siempre en la ampolla. El valor correspondiente en gramos de hemoglobina por litro, se refiere al que tendría una muestra de sangre diluida y preparada convenientemente para realizar la lectura fotolorimétrica correspondiente a la ampolla. Así, si en el frasco se indica una concentración de 572 mg/l, significa que dicha solución patrón posee la misma absorbancia que la de una solución de hemoglobina de 143 g/l, si la sangre total se ha diluido 250 veces. El patrón primario posee un espectro de absorción característico con un pico de máxima absorbancia (A) a 540 nm y una inflexión a 504 nm. La curva de longitud de onda <i>versus</i> Abs, desde $\lambda=750$ nm a $\lambda=460$ nm se observa en la figura 5, donde también se incluye la curva del reactivo. El valor de la Abs a 540 nm debe variar entre 0,400 y 0,404 y a 504 nm entre 0,248 y 0,251 según el lote y el instrumento de lectura utilizados. El cociente A_{540}/A_{504} debe oscilar entre 1,60 y 1,62. Si alguno de estos parámetros se modifican, indica deterioro del patrón.</p>
Técnica	<p>Por un lado, se efectuará el espectro de absorción de la solución de HiCN y del reactivo de Drabkin en un rango de 400 a 700 nm. Por otro lado se determinará la concentración de hemoglobina de una muestra problema siguiendo los pasos detallados a continuación:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Conectar el espectrofotómetro. 2. Homogeneizar adecuadamente la sangre mediante agitación suave con un sistema automático (rodillos/disco giratorio) durante un tiempo mínimo de 5 minutos o manualmente por inversión del tubo 20 veces. 3. Pipetear 5 ml de reactivo de Drabkin en un tubo de ensayo limpio. 4. Con una micropipeta añadir 20 μl de sangre homogeneizada al tubo que contiene 5 ml de reactivo de Drabkin. Al realizar esta operación, es fundamental eliminar el exceso de sangre que pueda quedar en las paredes externas del capilar, antes de introducirlo en el reactivo y procurar asimismo que no quede sangre adherida a las paredes internas de la pipeta. 5. Agitar el tubo a fin de homogeneizar correctamente la mezcla sangre-reactivo y esperar un mínimo de 5 minutos para que se produzca la hemólisis total y se complete la transformación de toda la hemoglobina en cianmetahemoglobina. 6. Leer la absorción de la solución a 540 nm, utilizando agua destilada como blanco. 7. Para calcular la concentración de hemoglobina es recomendable disponer de una curva de calibración (ver más adelante), de un estándar de Hb o de una solución patrón de HiCN.
Elaboración de la curva de calibración	<ul style="list-style-type: none"> • La gráfica de calibración tiene como finalidad calibrar el espectrofotómetro para una lectura determinada, calculando la corrección existente entre los valores de absorción leídos en el aparato y los correspondientes valores de concentración de hemoglobina. Para trazar este gráfico se preparan 5 soluciones de concentra-

ción de HiCN conocida y decreciente a partir del patrón de HiCN mediante diluciones sucesivas en reactivo de cianmetahemoglobina

- La concentración de hemoglobina correspondiente a cada tubo se determina a partir del grado de dilución y del valor indicado en la ampolla del patrón de HiCN. Una vez preparadas las soluciones patrón, se inicia la lectura a 540 nm del tubo que contiene sólo reactivo (tubo 5) y se ajusta la absorción (100% de transmitancia).
- Luego, partiendo de la solución de HiCN más diluida (tubo 5) se leen las restantes soluciones patrón. Finalmente, la relación entre los valores de Abs obtenidos y los correspondientes de concentración de hemoglobina se representan en un gráfico con los valores de Abs en las coordenadas y la concentración de hemoglobina en las abscisas.

**Tabla 3. Componentes: detergentes no iónicos:
Tritón X-100, Nonic 218, Nonidet/40, Quolac Nic 218.**

Ferricianuro potásico [K ₃ Fe(CN) ₆]	200 mg
Cianuro potásico [CNK]	50 mg
Fosfato monopotásico [KH ₂ PO ₄]	140 mg
Detergente no iónico*	1 ml
Agua destilada	hasta 1000 ml

Fuente: 946986126. Guía 2012 trabajo práctico Hematología.

Tabla 4. Concentración de HiCN.

Tubo	Patrón de referencia de HiCN (ml)	Reactivo de Drabkin (modificado) (ml)	Volumen final (ml)	Dilución (g/l)	Hb (g/l)*
1	3.0	0	3	0	145
2	1.5	1.5	3	1:2	72
3	1.0	2.0	3	1:3	48
4	0.5	2.5	3	1:6	24
5	0	3.0	3	0	0

*El valor de esta concentración dependerá del valor indicado en la ampolla del patrón de HiCN que se emplee en el trabajo práctico.

Fuente: 946986126. Guía 2012 trabajo práctico Hematología.

Causas de error en la determinación de la concentración de hemoglobina: la determinación de hemoglobina está sometida a posibles errores que deben ser considerados, algunos obedecen a características peculiares del espécimen como es la presencia de hiperlipemia o leucocitosis intensa ($>50 \times 10^9/l$). No obstante, la mayoría de las veces los errores se deben a defectos técnicos en la manipulación y el análisis del espécimen.

Errores al obtener la muestra de sangre:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Errores de extracción. 2. Empleo de anticoagulantes no recomendados. 3. Coagulación parcial de la sangre.
Errores de la dilución:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Empleo de pipetas automáticas descalibradas, pipetas sucias o húmedas. 2. No eliminar el exceso de sangre adherida a las paredes externas del capilar antes de introducirlo en el reactivo. 3. Dilución incompleta de la sangre en el reactivo.
Errores de la transformación de la hemoglobina en HiCN:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Empleo de reactivo de Drabkin mal preparado o vencido. 2. Lectura antes del tiempo necesario para la completa transformación de la Hb en HiCN.
Errores de la determinación:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Empleo de instrumentos no calibrados. 2. Cubetas sucias o deterioradas. 3. Soluciones turbias de HiCN.
Errores en la conservación del reactivo:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Congelación del reactivo, lo que produce transformación de $K_3Fe(CN)_6$ en $K_4Fe(CN)_6$ y una oxidación parcial de la Hb. 2. Conservación del reactivo en botellas de polietileno; se pierden grupos CN con formación exclusiva de metahemoglobina, en vez de HiCN, con lo que los valores de concentración de Hb obtenidos son inferiores a los reales.

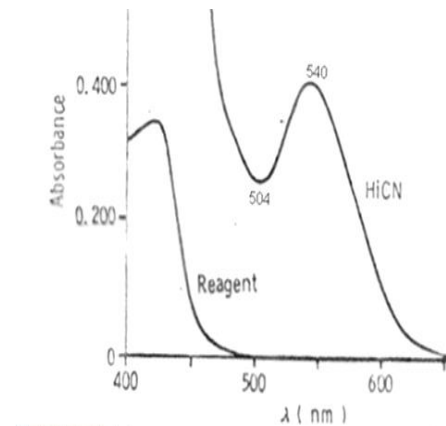


Figura 5. Espectro de absorción de la solución de HiCN y del reactivo de Drabkin.

Fuente: 946986126. Guía 2012 trabajo práctico Hematología.

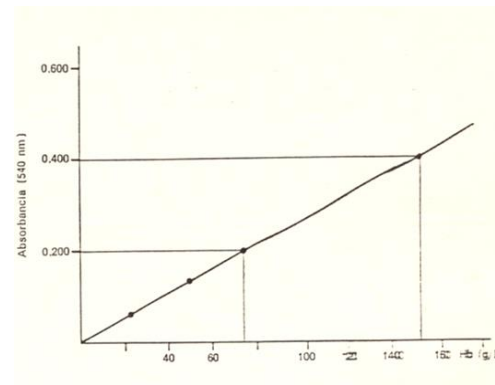


Figura 6. Curva de calibración elaborada a partir de una solución de cianmetahemoglobina de concentración conocida.

Fuente: 946986126. Guía 2012 trabajo práctico Hematología.

Recuento de células en cámara de Neubauer

Recuento de leucocitos por el método manual

1. Agregar 20 μ l de sangre a un tubo de Kahn que contiene 0,38 ml de solución de Türk. Esta solución contiene ácido acético al 1 % en agua destilada y el agregado de una punta de espátula de azul de metileno.
2. Homogeneizar la mezcla.
3. Cargar las cámaras de recuento. La cámara puede ser cargada con un capilar o con una micropipeta, evitando que queden burbujas para que la misma quede cargada uniformemente.
4. Ubicar el reticulado de la cámara con bajo aumento, lente de (10X) comprobar la ausencia de burbujas y que la distribución sea regular.
5. Aplicando mayor aumento se procede al recuento de los elementos presentes en los cuadrados angulares grandes (L) de la cámara. Las cuentas de los cuatro cuadrados no deben diferir entre sí en más del 20%. En caso contrario debe cargarse nuevamente la cámara. La lectura se realiza en los cuatro campos L. Además de los leucocitos contados dentro de cada uno de los cuadrantes, se deben contar todos los leucocitos adheridos en la línea horizontal su-

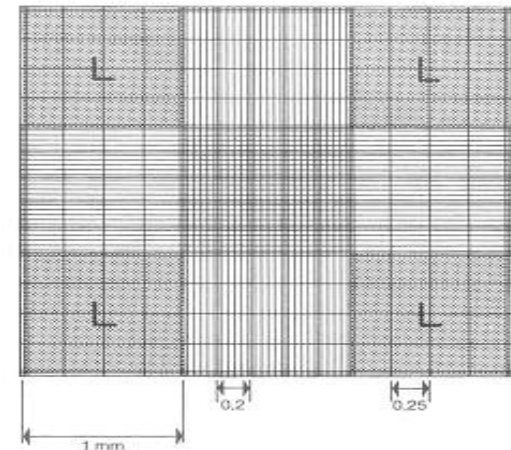


Figura 7. Recuento de leucocitos.

Fuente: <http://andyoeml.blogspot.com/p/camara-de-neubauer.html>

perior y vertical exterior o de lo contrario todos los leucocitos adheridos a la línea horizontal inferior y vertical interior.

Valores de referencia: si el valor obtenido (leucocitos/mm³ de sangre) es menor a 2500, se repite nuevamente el recuento empleando una dilución 1:10. Si por el contrario el número resulta notablemente elevado se emplean diluciones 1:100 o 1:200. Para el cálculo se emplea la siguiente fórmula:

$$(m \times 10 \times d)/n = \text{número de leucocitos/mm}^3$$

m=número de leucocitos contados en n (4) cuadrados de 1 mm de superficie y d=dilución utilizada.

Tabla 4. Valores de referencia WBC.

Adultos	5000 a 10.000/mm ³
Recién nacidos	10.000 a 25.000 /mm ³
Niños de 1 año	6.000- 18.000/mm ³
Niños de 4 a 7 años	6.000- 15.000/mm ³
Niños de 8 a 12 años	4.500 - 13.000 mm ³

Fuente: 946986126.GUÍA2012 trabajo práctico Hematología.

Recuento de plaquetas

- 1) Obtener sangre por punción venosa con anticoagulante EDTA (0,342 mol/l), en tubos plásticos.
- 2) Homogenizar adecuadamente la muestra y tomar 100 µl que se colocan en otro tubo plástico que contenga 1,9 ml de oxalato de amonio 1%. La solución hipotónica de oxalato de amonio en agua destilada induce hemólisis.
- 3) Incubar 10 a 15 minutos para permitir la hemólisis.
- 4) Cargar la cámara de Neubauer con el hemolizado y dejar que sedimenten las plaquetas en ambiente húmedo; se recomienda colocar la cámara dentro de una cápsula de Petri conteniendo un trozo de algodón humedecido.
- 5) Incubar 10 a 15 minutos en atmósfera húmeda.
- 6) Efectuar el recuento en microscopio en el reticulado central de la cámara (el que está dividido en 400 cuadrados pequeños comprendidos en 1 mm²). Se eligen 5 de los cuadrados que se encuentran subdivididos en 16 cuadraditos, como se muestra a continuación. La superficie de este cuadrado central es de 1 mm² y la cámara tiene una profundidad de 0,1 mm.

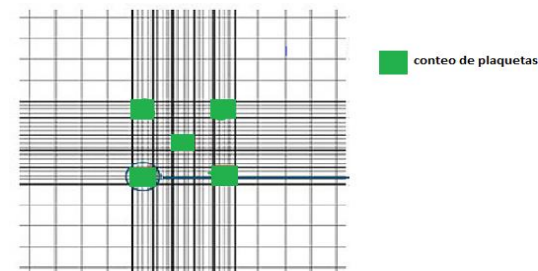


Figura 8. Recuento de plaquetas.

Fuente: <http://andyoeml.blogspot.com/p/cámara-de-neubauer.html>

- 7) Contar los 4 cuadrados de los extremos y el cuadrado central (por ende, serán 5 cuadrados con 16 cuadraditos c/u, o sea 80 cuadraditos).
- 8) Cálculo: sumar las plaquetas contadas en los 5 cuadrados y multiplicar por 1000 para obtener el número de plaquetas por mm^3 . El factor 1000 surge del producto:

$$\frac{20 \times 400}{80 \times 0,1 \text{ mm}^3} = 1000/\text{mm}^3$$

Donde 20 es el factor de dilución, 400 son los cuadraditos totales y 80 los cuadraditos contados. El volumen total del cuadrante es de $0,1 \text{ mm}^3$.

Observaciones: actualmente, los recuentos de plaquetas se realizan de forma automatizada en contadores hematológicos o en contadores específicos, habiéndose logrado un alto nivel de precisión (incluso en trombocitopenias). El recuento manual suele efectuarse para la comprobación de la cifra de plaquetas en trombocitopenias graves y en el caso de plaquetas gigantes en las que el recuento automático no es fiable. Los valores plaquetarios de referencia en adultos es $150 \times 10^9/\text{l}$ a $400 \times 10^9/\text{l}$.

Recuento de glóbulos rojos

Recuento manual: si bien resulta obsoleto para fines diagnósticos, el detalle de soluciones y técnica puede ser aplicable en otras áreas. Consiste en el recuento en una dilución de sangre entera anticoagulada. Es un método poco usado debido al elevado error que presenta.

El líquido diluyente es la solución fisiológica o citrato de sodio al 3,8% o solución de Hayem (HgCl_2 0,25%, $\text{Na}_2 \text{SO}_4$ 2,5%, NaCl 0,5%). La dilución empleada es de 1/200, para lo cual se mide exactamente:

- Solución fisiológica o citratada: 3,98 ml
- Sangre: 0,02 ml

El recuento se realiza en la cámara de Neubauer (40X) cuyo esquema es el siguiente:

- El recuento de hematíes se realiza en el cuadrado central; se eligen 5 de los cuadrados que se encuentran subdivididos en 16 cuadrados pequeños, como se muestra en la figura 9. Las líneas reforzadas o triples, sirven únicamente como límites de cada cuadrado que contiene los 16 cuadrados pequeños. Se deben contar 5 de estos cuadrados. La superficie de este cuadrado es de 1 mm^2 y la cámara tiene una profundidad de $0,1 \text{ mm}$.

- Con la dilución indicada, luego de agitar adecuadamente, se carga la cámara y se cuentan los glóbulos rojos de los 80 cuadrados pequeños (zona sombreada). La cámara puede ser cargada con un capilar, evitando que queden burbujas y que la misma sea cargada uniformemente.

Considerando que el retículo tiene 400 cuadrados pequeños en total, el cálculo que se debe hacer es el siguiente:

$$\frac{N \times D \times FC \times ST}{TC} = n^{\circ} \text{ de glóbulos rojos/mm}^3$$

Dónde:

N: número de eritrocitos contados.

D: Título de la dilución realizada (200).

FC: Factor de corrección de la profundidad, para llevar a 1mm³ (10).

ST: Total de cuadrados pequeños en la superficie de 1mm² (400).

TC: Total de cuadrados pequeños contados.

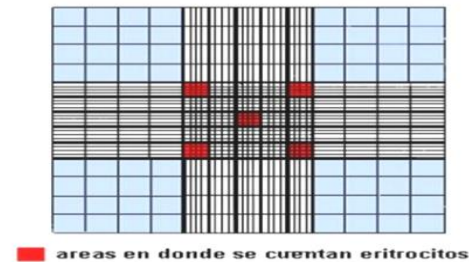


Figura 9. Recuento de glóbulos rojos.

Fuente: <http://andyoeml.blogspot.com/p/camara-de-neubauer.html>

Causas de error en el recuento en cámara de Neubauer: el recuento manual de eritrocitos tiene un error del 10%, el cual puede deberse a:

- Errores de extracción.
- Dilución o hemoconcentración.
- Coagulación parcial.
- Hemólisis.
- Mala homogeneización por agitación insuficiente de la sangre.
- Utilización de material mal calibrado, sucio o húmedo.
- Cámara de Neubauer mal ajustada, sucia o mojada.
- Llenado incompleto de la cámara Neubauer.
- Empleo de cubreobjetos deformable, no rígido.
- Células mal distribuidas en el fondo de la cámara.
- Errores del operador al realizar el recuento.
- Errores al efectuar los cálculos.

Tabla 5. Valores de referencia de glóbulos rojos.

Edad	Sexo	Intervalo de referencia
recién nacidos	Ambos	$4,7 \times 10^{12}/l$ a $6,3 \times 10^{12}/l$
Niños (2 a 12 años)	Ambos	$4,0 \times 10^{12}/l$ a $5,3 \times 10^{12}/l$
Adultos jóvenes (12 a 18 años)	Mujeres	$4,1 \times 10^{12}/l$ a $5,1 \times 10^{12}/l$
	Hombres	$4,5 \times 10^{12}/l$ a $5,3 \times 10^{12}/l$
Adultos (19 a 60 años)	Mujeres	$4,1 \times 10^{12}/l$ a $5,2 \times 10^{12}/l$
	Hombres	$4,6 \times 10^{12}/l$ a $5,9 \times 10^{12}/l$

Fuente: 946986126.GUÍA2012 trabajo práctico Hematología

Capítulo 4

Analizadores hematológicos automáticos o contadores hematológicos

Introducción

La biometría aporta al diagnóstico o confirma una diversidad de patologías que van desde la presencia de infecciones agudas y crónicas, trastornos mieloproliferativos, mielodisplásicos, leucemias y otras alteraciones del sistema hematopoyético integral. En la actualidad, la biometría hemática incluye contajes totales de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas; contajes porcentuales de los diferentes grupos de células de la serie blanca, valores de hemoglobina y hematocrito. Con la ayuda de fórmulas matemáticas se obtienen valores calculados de hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y volumen corpuscular medio (VCM).

Los contadores hematológicos son equipos de última tecnología que utilizan múltiples aplicaciones físico químicas, que junto con la informática, permiten analizar los diferentes parámetros que se incluye el hemograma. Estos equipos realizan sus análisis utilizando diversos tipos de principios analíticos o tecnológicos, en forma aislada o combinando más de un principio. Todo este complejo procedimiento se realiza en cada muestra, sobre la base de un análisis individual de 32.000 células, en un tiempo cercano al minuto, lo que demuestra su alto grado de eficacia y eficiencia, proporcionando alta credibilidad al resultado obtenido destacándose la oportunidad con que se obtiene el resultado.

Entre los principios analíticos o tecnológicos se encuentran:

- Citometría de flujo con tecnología de dispersión de luz láser polarizada en multiángulos, a través de un láser semiconductor.
- Detección por corriente directa o impedancia electrónica.
- Enfoque hidrodinámico de flujo laminar.
- Fotometría para hemoglobina.
- IRF (Inmuno fluorescencia radial).

La utilización de estos principios analíticos en los diferentes parámetros puede resumirse así:

- La impedancia electrónica y medición volumétrica ayuda al análisis de glóbulos blancos, glóbulos rojos, plaquetas y además permite calcular el hematocrito.
- La espectrofotometría ayuda al análisis de la hemoglobina.
- La impedancia, la citometría de flujo y la citoquímica permiten la identificación de los leucocitos y la fórmula (5 diferenciales).

- La impedancia, la citometría de flujo y la fluorescencia ayuda al análisis de reticulocitos con inmunofluorescencia radial (IRF) y los CD.

Principios de operacionalización

La citometría de flujo utiliza el principio del enfoque hidrodinámico, el cual permite que la célula entre al centro del flujo circundante o del fluido transportador. Las células individuales dispersan la luz, en la medida que pasan por una o más de las fuentes de luz para la excitación. Los fluorocromos son excitados por una fuente alta de energía. Los detectores ópticos convierten la luz dispersa y emitida desde las células en pulsos electrónicos; esta luz se envía a diferentes detectores usando filtros ópticos para posteriormente los pulsos o señales eléctricas sean procesados para el análisis, clasificación, categorización o separación de células y almacenamiento de datos.

Aplicaciones de la citometría de flujo

La citometría de flujo agrega un componente adicional en el soporte de la información para diagnosticar leucemias y linfomas. Puede procesarse un frotis del aspirado de médula ósea, interpreta los frotis de sangre y genera resultados de la biometría hemática. Los síntomas del paciente, la citogenética, la tinción citoquímica y la citometría de flujo aportan datos para el diagnóstico del paciente.

La inmunofenotipificación es útil para distinguir una leucemia linfocítica aguda de una mieloide aguda y categorizar las leucemias linfocíticas y mieloides; su utilidad radica en la clasificación de los linfomas, evaluación de la respuesta terapéutica y detección de la enfermedad residual mínima después del tratamiento.

Otras aplicaciones de la citometría de flujo involucran el diagnóstico de trastornos de inmunodeficiencia en los que se incluyen enumeración de subconjuntos de linfocitos vistos en el HIV, la evaluación de la función de los neutrófilos ayuda al diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica (EGC), en el síndrome de hiper-IgM, en la deficiencia de adhesión leucocitaria y en la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN).

Las aplicaciones clínicas en el trasplante de órganos incluyen el monitoreo de los pacientes que reciben terapia de antirechazo, la detección de aloanticuerpos ALH y la enumeración de células madre y células progenitoras CD34.

Adicionalmente, esta técnica tiene aplicaciones clínicas en la medicina transfusional, incluyendo la detección de hemoglobina fetal y hemorragia fetomaternal, midiendo los glóbulos blancos residuales en la sangre con leucocitos reducidos.

La citometría de flujo es una herramienta diagnóstica con mucha aplicación en la medicina contemporánea que eleva la calidad de atención en el paciente.

Tabla 1. LLA: leucemia linfoblástica aguda, LMA: leucemia mieloblástica aguda, CD: cúmulos de diferenciación.**Mieloide**

LMA	CD33	CD34	ALH-DR	CD11b	CD13	CD14	GlicoA	CD61
M0	+	+	+	-	+	-	-	-
M1	+	+	+	+/-	+	-	-	-
M2	+	+	+	+/-	+	-	-	-
M3	+	-	-	-	+	-	-	-
M4	+	-	+	+	+	+	-	-
M5	+	-	+	+	+	+	+	-
M6	+/-	-	+/-	-	-	-	+	-
M7	+/-	-	+	-	-	-	-	+

Linfoide

LLA	CD10	CD20	CD19	CD2	CD5	CD7	Clg	S1G	TdT
Pre-B temprana	+	-	+	-	-	-	-	-	+
Pre B	+	+	+	-	-	-	+	-	+
B madura	+/-	+	+	-	-	-	-	+	-
Precursores T	-	-	-	+	+	+	-	-	+

LLA: leucemia linfoblástica aguda, LMA: leucemia mieloblástica aguda, CD: cúmulos de diferenciación.

Fuente: Ciesla Betty, Hematología en la práctica, 2014, AMOLCA, Actualidades Médicas, pag.52, 53 Venezuela.

Citometría de flujo

Los parámetros que se analizan por citometría pueden ser: características intrínsecas de las células como tamaño, complejidad de su citoplasma o de su núcleo; parámetros relacionados con características antigénicas y/o demás características morfológicas. Este análisis puede incluir además, señales de fluorescencia con la ayuda de un fluorocromo como es el caso de los CD. Como procedimiento, mide las características físicas, propiedades químicas y fenotipos de las células y define la maduración de los estadios celulares.

La técnica usa principios de dispersión-excitación de la luz y emisión de fluorocromo para generar datos específicos de las células o partículas. Los datos obtenidos permiten medir la cantidad, tamaño, morfología y estructura interna y externa de las células en cuestión. Estas aplicaciones son utilizadas para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de la enfermedad. Las señales fluorescentes emitidas por los colorantes que están unidos a anticuerpos monoclonales específicos, tienen varias aplicaciones en el diagnóstico de malignidades hematológicas. La citometría de flujo es un método mejorado sobre la citoquímica y la morfología para el diagnóstico de malignidades hematológicas. Los citómetros de flujo constan de tres sistemas:

- Sistema de fluidos o de transporte.

- Sistema óptico para la detección de la luz dispersa.
- Sistema de detección de señales de luz fluorescente y la electrónica para monitorear y controlar la operación y el almacenamiento de los datos.

Preparación de la muestra: las muestras utilizadas para el análisis incluyen núcleos de médula ósea, sangre periférica, factor estimulante de colonias (FEC), fluido pleural, aspirados de aguja fina, ganglios linfáticos y tumores sólidos. Las características celulares que son medidas incluyen granularidad, área superficial de la célula y la complejidad interna.

La médula ósea y la sangre periférica son recolectadas en EDTA K2 o K3. Las muestras son almacenadas a temperatura ambiente y se deben analizar dentro de las 24 horas posteriores a la recolección. El tejido linfoide es puesto en un contenedor estéril que contiene un medio de tejido frío.

Aplicaciones de citometría de flujo: incluye la inmunofenotipificación, diagnóstico y estadificación de la leucemia/linfoma, análisis del contenido de ADN, contenido de ARN, estudios enzimáticos y enumeración de células fetales.

Análisis: los datos recolectados del citómetro de flujo son analizados para determinar las propiedades de dispersión de luz de las células, lo que determina cual población requiere un examen más riguroso; la luz se dispersa en todas las direcciones, pero es recolectada a lo largo del eje del haz de láser o dispersión de luz en ángulo hacia adelante y en ángulo de 90 grados o dispersión de luz en ángulo lateral. Las emisiones fluorescentes se recolectan en el ángulo de 90 grados.

La luz dispersada hacia adelante (FALS) está relacionada con el tamaño de las células (mayor tamaño del FALS más grande es la célula). La luz dispersada hacia los lados está relacionada con la complejidad interna de la célula incluyendo la densidad y la granularidad celulares. Entre mayor sea la señal de la luz dispersada hacia los lados, más compleja internamente es la célula. El fotodiodo recolecta la luz dispersada hacia adelante y los fotomultiplicadores (PMT) recolectan la luz dispersa a los lados y las emisiones fluorescentes. Los filtros definen la longitud de la onda de la luz que alcanza cada PMT.

Las poblaciones celulares se identifican trazando los dos parámetros de dispersión de la luz en los ejes x-y. Los monocitos maduros, linfocitos y granulocitos se identifican por medio de sus propiedades de dispersión de la luz. Este proceso se denomina selección de poblaciones, lo cual permite identificar y enumerar subconjuntos de células para analizar una población específica.

El análisis de las propiedades fluorescentes es realizado mediante anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia. Los fluorocromos son colorantes que absorben la luz en una longitud de onda y luego emiten la luz a una longitud de onda diferente o más alta. Los fluorocromos, por sí mismos o acoplados a anticuerpos monoclonales, son usados para evaluar la viabilidad, inmunofenotipo y

contenido de ácido nucleico. La lista de fluorocromos ha aumentado en los últimos años.

Tabla 2. Fluorocromos comúnmente utilizados.

Sonda reactiva y conjugada	Longitud de onda de excitación (NM)	Longitud de onda de emisión (NM)
Fluorescente (FIT)	495	519
Ficoeritrina (PE)	565	575
PE-carbocianina	565	670
PE-Cy 5.5	565	695
PE-Cy7	565	770
Per-Cp	490	670
Cy5	650	665
PCA-Cy7	650	770
PCA-Cy7	650	770
Alexa fluors		
Alexa 350	350	445
Alexa 430	435	445
Alexa 488	500	520
Alexa 700	700	720
Contenido de ADN		
DAPI	360	460
Naranja de acridina	495	535
Yoduro de propidio	535	620
7-AAD	545	650

Fuente: Ciesla Betty, Hematología en la práctica, 2014, AMOLCA, Actualidades Médicas, pag.52, 53 Venezuela.

El análisis de fluorocromos implica el acoplamiento de un fluorocromo a un anticuerpo monoclonal. La tinción de células específicas ayuda a identificar, caracterizar y enumerar las poblaciones celulares normales y anormales.

Los cúmulos de diferenciación (CD) se definen como un grupo de anticuerpos que reconocen el mismo antígeno. Estos se conocen como marcadores CD. Estos marcadores CD definen características de linaje y la función celular y el estadio de desarrollo de las células. La inmunofenotipificación se refiere al uso de anticuerpos monoclonales o policlonales para la detección de antígenos específicos.

La mayoría de instrumentos de citometría de flujo usan cuatro marcadores diferentes de anticuerpos monoclonales, cada uno marcado con un fluorocromo diferente, esto se denomina análisis en color múltiple. Los datos fluorescentes pueden ser examinados por números absolutos o por porcentaje de células que son positivas en intensidad de fluorescencia, la cual está relacionada con la densidad del antígeno. Esta intensidad de fluorescencia o densidad del antígeno ayuda en la identificación de los estadios de maduración y fenotipos de las células y permite identificar criterios para el diagnóstico y el pronóstico.

Los datos generados se pueden presentar en un histograma de uno o dos parámetros. En el histograma de un solo parámetro, el eje de X es la intensidad en fluorescencia y el número de eventos se traza en el eje Y.

El histograma de dos parámetros puede ser representado de varias maneras, un diagrama de puntos muestra cada célula en el gráfico como un evento único. El gráfico de contorno muestra diferentes densidades celulares. Los gráficos de los dos parámetros se dividen en cuatro cuadrados o regiones que generan estadísticas en las subpoblaciones. Los datos que estos cuadrantes representan son células negativas, positivas o doblemente positivas. Los porcentajes de células positivas son calculados de acuerdo con el número de eventos dentro de cada cuadrante. Los eventos en el cuadrante superior derecho (UR) son doble positivos para los dos marcadores CD seleccionados y los eventos en el cuadrante inferior izquierdo (LL) son negativos para los dos marcadores. El cuadrante superior izquierdo (UL) y el cuadrante inferior derecho (LR) muestran poblaciones positivas para un solo CD (ver figura 1).

Eje Y	UL	UR
	LL	LR
Eje X		

Figura 1. Ubicación de los anticuerpos de los CD
Fuente: Ciesla Betty, Hematología en la práctica, 2014, AMOLCA, Actualidades Médicas, pag.52, 53 Venezuela

Se representa los datos de la citometría de flujo: LL (lower left) son células negativas para ambos ejes x-y. UR (upper right) son células positivas para ambos ejes x-y; UL (upper left) son células positivas para el eje “y” y negativas para el eje x; LR (lower right) son células positivas para el eje x y negativas para el eje y. Los diferentes anticuerpos CD son colocados en los ejes de X y Y.

La intensidad de fluorescencia también puede ser medida y representa la fluorescencia de la célula en una población seleccionada. En el diagnóstico de enfermedades, los datos generados pueden contribuir a caracterizar y ayudar en el tratamiento de varios tipos de leucemias y linfomas. El conteo celular total, los porcentajes de poblaciones y las diferencias en el brillo de la fluorescencia entre las poblaciones se pueden analizar para definir un mejor tratamiento.

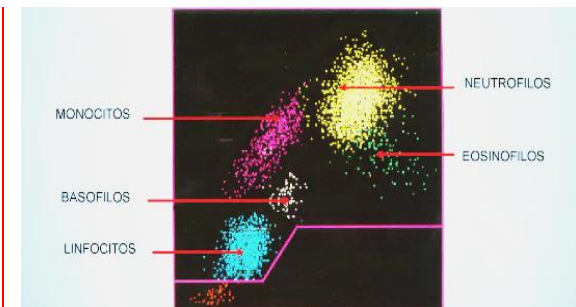


Figura 2. Ubicación de las células en el dispersograma.
Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013.

Tabla 3. Cúmulos de diferenciación de células inmaduras y células B.

Inmaduras	
CD34	Células madre
CD38	Hematopoyesis
CD117	Células madre, mastocitos
TdT precursores	Precursores linfoides
HLA-DR	hematopoyéticas
Células B	
CD10	Precursores B
CD19	Precursor B maduro
CD20	Activación de células B
CD22	Células B con activación citoplasmática
Kappa	Células B con receptor Fc

CD cúmulos de designación; Gp glicoproteínas: ALH antígeno leucocítico humano; MPO mieloperoxidasa; TdT transferasa desoxinucleotidil terminal

Tabla 4. Cúmulos de diferenciación de células lambda y T.

Lambda	
FCM7	Células B
Células T	
CD2	Temprana
CD3	Célula T-pan
CD4	Subconjunto de células T
CD5	Célula T
CD7	Temprana
CD8	Célula T
CD56	Subconjunto de células T

CD cúmulos de designación; Gp glicoproteínas: ALH antígeno leucocítico humano; MPO mieloperoxidasa; TdT transferasa desoxinucleotidil terminal

Fuente: Ciesla Betty, Hematología en la práctica, 2014, AMOLCA, Actualidades Médicas, pag.52, 53 Venezuela.

Tabla 5. Cúmulos de diferenciación eritroide, megacariocito, granulocítica y monocítica.

Eritroide	
CD36	
CD71	
Glicoforina A	
Megacariocito	
CD31	
CD41	CPIIb/IIa
CD42	
CD61	CPIIb/IIIa
Granulocítica	
CD13	Pan mieloide
CD33	Pan mieloide
CD15	Pro mielocito
CD11b	Mielocito
MPO	Mieloide
Monocítica	
CD11b	Granulocítica y monocítica
CD13	Monocítica temprana
CD14	Monocitos maduros
CD33	Granulocítica y monocítica
ALH-DR	Maduración monocítica

CD cúmulos de designación; Gp glicoproteínas: ALH antígeno leucocítico humano; MPO mieloperoxidasa; TdT transferasa desoxinucleotidil terminal

Fuente: Ciesla Betty, Hematología en la práctica, 2014, AMOLCA, Actualidades Médicas, pag.52, 53 Venezuela.

Medición óptica

Ayuda al análisis de leucocitos y se utiliza la separación por dispersión de la luz láser polarizada en multiángulos. Posee cuatro detectores ópticos (0° , 10° , 90° D y 90°) que se encargan cada uno de diferentes características celulares.

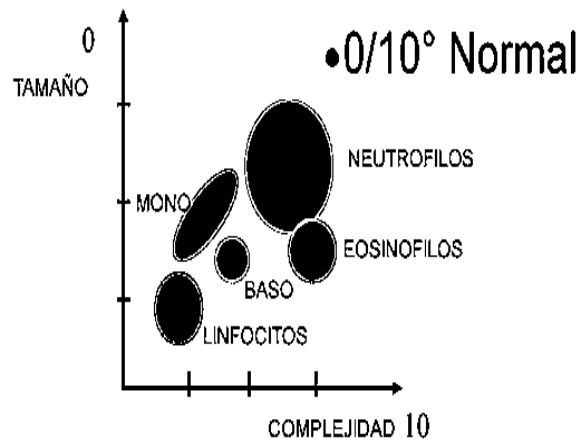


Figura 3. Dispersograma normal.

Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013.

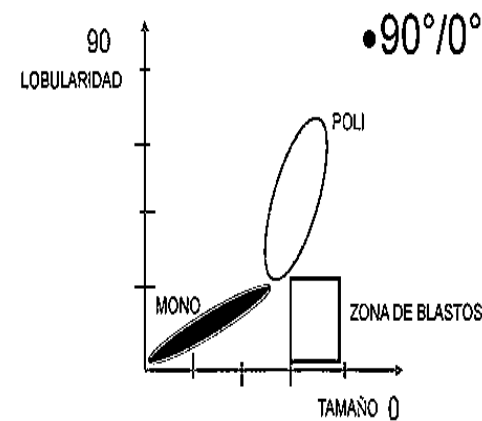


Figura 4. Dispersograma normal.

Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013.

Histogramas

Los histogramas ayudan a tener una idea de la distribución del tamaño de las células; muestran el tamaño medio de las células dentro una población celular específica. En el caso de los glóbulos rojos y plaquetas, se grafican a manera de curvas en un plano de coordenadas. El eje de las abscisas expresa el volumen celular en fentolitros y en el eje de las ordenadas expresa la cantidad de partículas contadas. Mientras más cerca el gráfico se ubica al punto cero o de intersección de ambos ejes, menor es el volumen de la población celular y mientras más alta sea la curva mayor será el número de eventos contados y viceversa.

Dicho de otra manera, se puede deducir que mientras mayor sea la altitud alcanzada por la curva en el eje de las abscisas, se grafica el valor medio del volumen que se examina (VCM, VPM) y mientras más ancha sea la base de la curva se expresa la variación de distribución del volumen de las partículas o anisocitosis (RDW, PDW).

Es importante observar que al tratarse de un histograma, el gráfico de las tres series: glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas, se encuentran en el mismo plano de coordenadas, iniciando con las más pequeñas que son las plaquetas (4 a 15 fl), luego los hematíes (15

a 90 fl) y finalmente los leucocitos (entre 90 y 450 fl). En algunas marcas de equipos, seguramente por razones de espacio en la pantalla, este gráfico se presenta fragmentado.

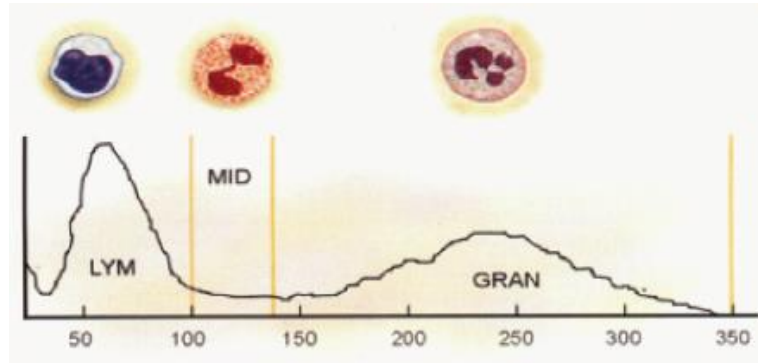


Figura 5. Histograma serie blanca.

Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013.

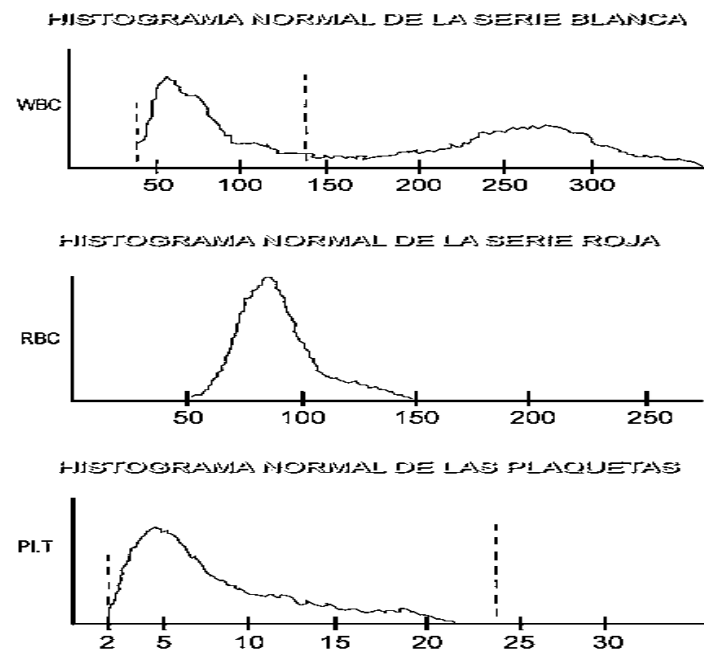


Figura 6. Histograma normal.

Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013.

- De Plaquetas.

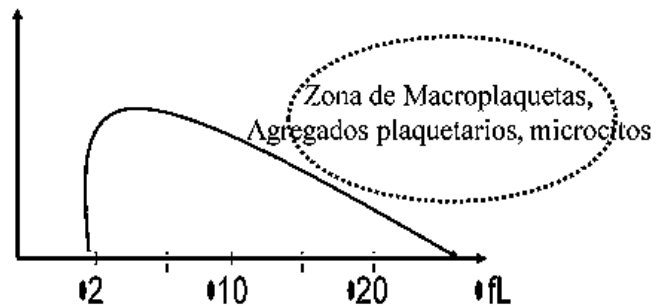


Figura 7. Histograma de plaquetas.

Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013.

Dispersogramas

Son gráficos que ayudan al análisis y conteo de células sanguíneas; se lo realiza en analizadores de 5 parámetros que juntos producen una “dispersión” de cada una de las células dentro del grupo, basándose en la medición de la masa/volumen de cada una de estas. Esta tecnología también identifica las características de los núcleos, presencia o no de material nuclear, granulaciones citoplasmáticas y lobulaciones nucleares, que permiten identificar clara y plenamente cada una de las células presentes.

Los gráficos que este tipo de instrumentos permiten alcanzar es la distribución espacial tridimensional de cada uno de los grupos celulares, tomando en cuenta su cantidad, permitiendo inclusive identificar áreas específicas para varios tipos de células inmaduras o atípicas.

Índices eritrocitarios o hematométricos

Proporcionan información respecto al tamaño y el contenido de hemoglobina en los glóbulos rojos suministrando el volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). Wintrobe en 1929 introdujo los índices eritrocitarios; éstos índices se calculan a partir de la concentración de glóbulos rojos (CGB), de la concentración de hemoglobina (Hb) y del hematocrito (HCT).

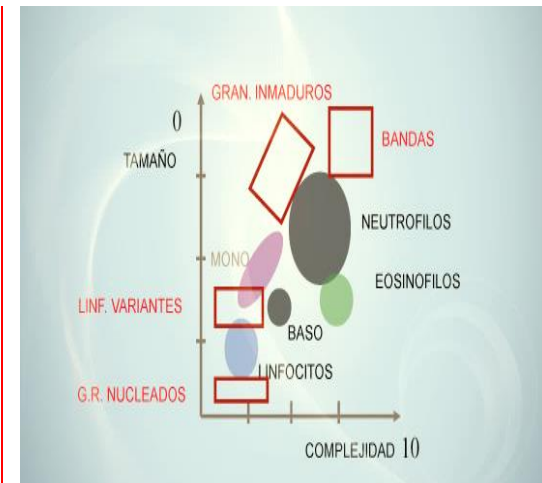


Figura 8 Ubicación de la células en el dispersograma

Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013

Biometría hemática o hemograma automatizado

La actual hematimetría se basa en la identificación celular a partir de:

- Identificación de la membrana con su propia característica y capaz de reaccionar ante elementos físicos o químicos.
- Identificación de su contenido citoplasmático pigmentario para el eritrocito o gránulos en plaquetas o granulocitos.
- Imágenes tridimensionales de las células.
- Lobulaciones del núcleo como en los leucocitos.

En la actualidad existen dos parámetros que se analizan en la biometría hemática:

- Parámetros directos.
- Parámetros indirectos.

Parámetros directos: los equipos automatizados miden directamente y reportan hemoglobina, recuento de leucocitos y fórmula diferencial, glóbulos rojos, reticulocitos y plaquetas

1. **Hemoglobina (Hb):** los equipos actuales miden fotométricamente la hemoglobina y reportan en g/dl.

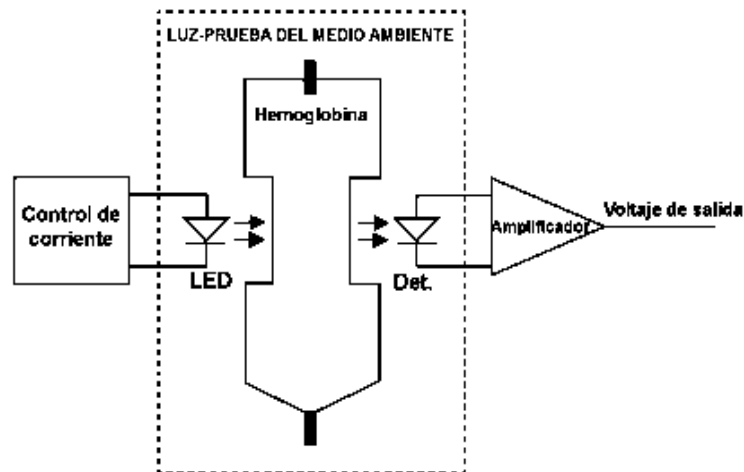


Figura 9. Fotometría, hemoglobina.

Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013

2. **Recuento de leucocitos y su fórmula porcentual:** los glóbulos blancos constituyen los elementos celulares sanguíneos de mayor tamaño; se los clasifica básicamente de acuerdo a su composición citoplasmática y nuclear (granulaciones) y a la morfología del núcleo en: granulocitos o polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos); y agranulocitos (monocitos y linfocitos).
3. **Granulocitos:** toman su denominación por poseer diversos tipos de granulaciones:
 - a. Primarias: formadas por lisosomas con enzimas para digestión y son semejantes en todos los granulocitos.
 - b. Secundarias: específicos para cada tipo.
 - c. Terciarias: se adquiere por estímulos inmunológicos e inflamatorios.

La cuenta de glóbulos blancos se reportan en unidad de volumen ($10^3/\mu\text{l}$).

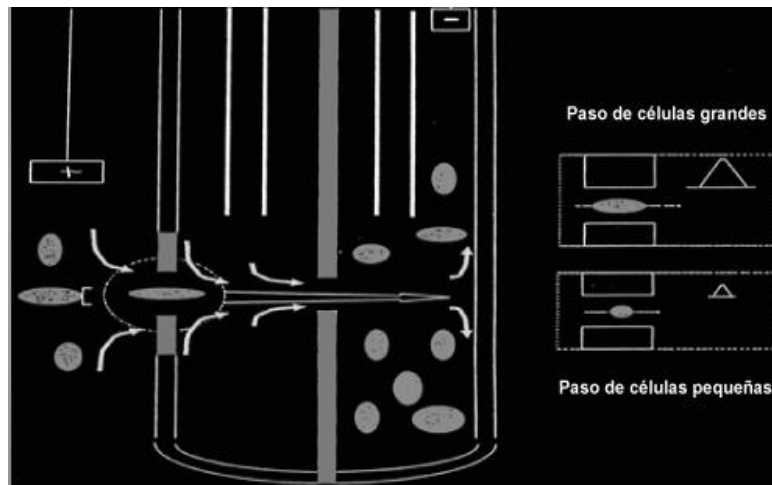


Figura 10. Impedancia.

Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013.

4. **Glóbulos rojos:** son células que se caracterizan por no presentar núcleos y contienen en su interior hemoglobina; poseen un tamaño promedio $7,5 \mu\text{m}$ de diámetro. Se reporta en unidad de volumen ($10^6/\mu\text{L}$).
5. **Plaquetas o trombocitos:** son fragmentos derivados del citoplasma del megacariocito, incoloras, sin núcleo, con forma de esferas aplanadas redondeadas de 2 a $4 \mu\text{m}$. Su vida media es 8 a 13 días; la mayor reserva está en el bazo (aproximadamente el 33% del total). Su conteo en condiciones normales oscila entre 150.000 a $400.000/\text{mm}^3$. Su función principal es participar en el proceso de hemostasia y coagulación de la sangre. Se mide por impedancia pero en el caso de que se encuentren severamente

afectadas en tamaño, forma o número, se puede determinar plaquetas de forma óptica utilizando metodología de citometría de flujo fluorescente con dispersión de rayo láser. Se reporta en unidad de volumen ($10^3/\mu\text{L}$).

Tabla 6. Características de los hematíes.

Vida media	120 días
Forma	Discos bicóncavos
Dimensiones	6 a 8 μm
Reticulocitos	<1%
Eritropoyesis	7 a 8 días

Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013.

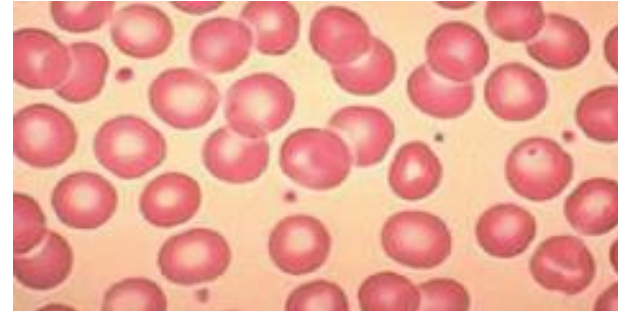


Figura 11. Hematíes.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Tabla 7. Características de las plaquetas.

Vida media	8 a 10 días
Forma	Esférica aplanada
Dimensiones	2 a 4 μm de diámetro
Número	150.000 a 400.000/mm^3
Regulados	Trombopoyetina
Reserva	Bazo

Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013.

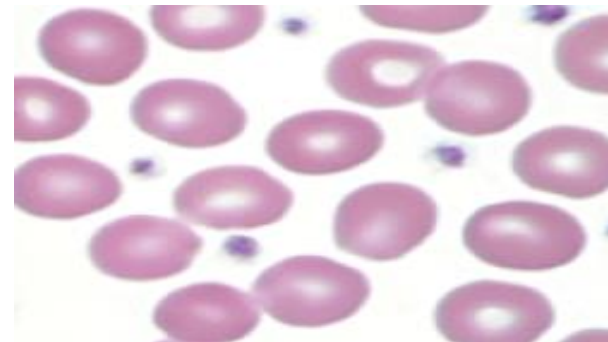


Figura 12. Plaquetas.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología Práctica. 2008.

6. **Recuento de reticulocitos:** son eritrocitos que carecen de núcleo pero poseen ARN residual. Su identificación en el analizador se realiza mediante análisis del RNA por inmunofluorescencia radial (IFR), los reticulocitos unen una cantidad variable de colorante (polimetino) dependiendo de la cantidad de ARN que contengan; la intensidad de luz dispersa frontal entre 0° a 10° y lateral de 90° son indicadores del tamaño celular y su contenido de ARN respectivamente. Identificadas en el ángulo de 90° ,

separa reticulocitos maduros de inmaduros. Los rangos referenciales comúnmente usados se ubican entre 0,5% a 2,5% en adultos y 2,0% a 6,0% en recién nacidos.

7. **Granulocitos inmaduros (Gi):** la determinación del porcentaje de granulocitos inmaduros que se reporta en la biometría agrupan a promielocitos, mielocitos y metamielocitos; constituye un parámetro que permite detectar tempranamente desordenes inflamatorios sistémicos por estrés o reacciones leucemoides y leucemias. Si se muestran significativamente altos (sobre 3%) constituye una alerta que induce a observar frotis de sangre periférica y definir el grado de maduración leucocitaria, permitiendo distinguir tempranamente a pacientes con desórdenes hematológicos (síndromes mielodisplásicos, cuadros de infecciones y sepsis). El reporte completo y oportuno permite al médico disponer para el inmediato diagnóstico diferencial entre estas patologías y su posterior tratamiento. Se ha demostrado con claridad que las cifras de Gi son significativamente más altas en pacientes con infección severa y en procesos proliferativos de la médula ósea. El fundamento técnico de este hallazgo se explica porque las células inmaduras (promielocitos, mielocitos y metamielocitos) tienen mayor cantidad de RNA y por ello presentan signos más grandes de fluorescencia.

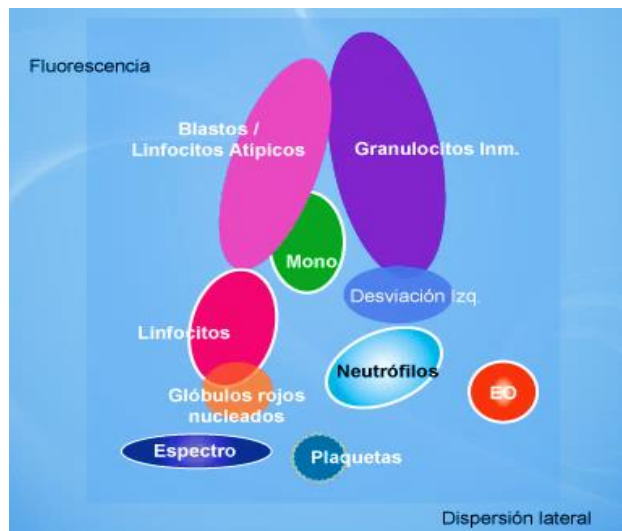


Figura 13. Diagrama de dispersión anormal.

Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013.

8. **Fracción de reticulocitos inmaduros (IRF):** es un parámetro que indica la inmadurez del reticulocito y se detecta por la intensidad de la fluorescencia que es directamente proporcional a la cantidad de ARN que posee cada uno siendo más intensa cuando el reticulocito es más joven. Un aumento en la intensidad de fluorescencia media y alta indica la presencia de reticulocitos inmaduros y su cuantificación relacionada con el recuento total de reticulocitos es útil para establecer un índice de la velocidad de producción de los eritrocitos. El índice de IRF se utiliza para la clasificación y monitoreo en terapias de anemias, monitoreo en el uso de eritropoyetina y para el control en el trasplante de médula ósea. Mientras más joven sea la célula, mayor cantidad de RNA tiene y contiene más alta señal de fluorescencia por lo que se ubica más a la derecha en el dispersograma. Este parámetro permite monitorear el tratamiento de los pacientes de acuerdo al estado de la anemia, optimiza costos por diagnóstico temprano y terapia adecuada y oportuna.

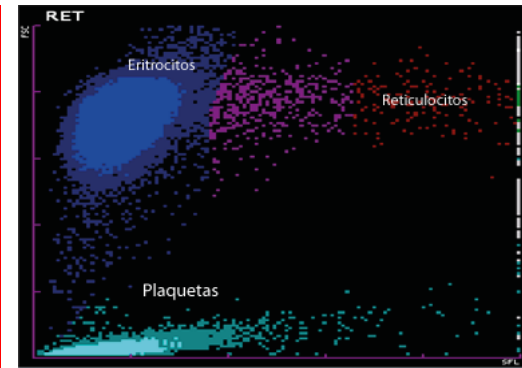


Figura 14. Fracción de reticulocitos inmaduros (IRF).
Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013.

9. **Reticulocitos:** los equipos nuevos permiten medir los diferentes tipos de reticulocitos y su interpretación correcta para el diagnóstico y manejo de las anemias:

- RET-Y: promedio de la dispersión de los reticulocitos.
- RBC-Y: promedio de la dispersión de eritrocitos.
- RET-He (contenido de hemoglobina de los reticulocitos): este parámetro es el único que permite calcular la recuperación de la deficiencia de hierro por producción de glóbulos rojos, con suficiente contenido de hemoglobina luego de tres días.

10. **Fracción de plaquetas inmaduras (FPI):** indican la actividad de la médula ósea y tienen gran importancia cuando están en cantidades bajas porque denotan trombocitopenia. El conteo de este tipo de plaquetas jóvenes no es posible realizar en todos los contadores hematológicos y su fundamento técnico es similar a los anteriores, las formas jóvenes tienen mayor cantidad de RNA y por ende más fluorescencia y se ubican hacia la derecha del dispersograma. La diferenciación de plaquetas maduras e inmaduras facilita el diagnóstico de trombocitopenia:

- FPI por ciento elevado: se presenta en destrucción o incremento de consumo de plaquetas.
- FPI por ciento bajo: se presenta en daño de médula ósea.
- FPI por ciento: es un marcador temprano de regeneración de médula ósea.

El monitoreo continuo de plaquetas inmaduras podría evitar la transfusión de plaquetas si se demuestra regeneración medular. Se considera normal un 6% de plaquetas inmaduras.

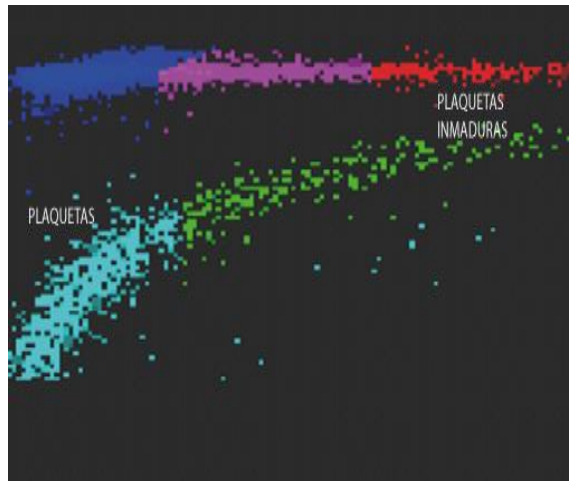


Figura 15. Plaquetas inmaduras.

Fuente: Salazar Ramiro, Medicina de Laboratorio, 2013

Parámetros indirectos o calculados: algunos de estos parámetros tuvieron su origen en los años treinta con Wintrobe y representó gran utilidad diagnóstica. Estos parámetros suelen derivarse de los parámetros directos obtenidos mediante análisis por los contadores hematológicos y calculados constituyen valores muy orientadores en los diferentes diagnósticos para los que se utilizan. Entre estos están: VCM, HCM, CHCM.

1. **Hematocrito (HCT):** el hematocrito es el porcentaje de los elementos celulares o figurados de la sangre con relación a sus componentes líquidos, se expresa en porcentaje total o en fracción decimal (g/dl).
2. **Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM):** es la concentración media de hemoglobina en un volumen determinado de eritrocitos concentrados. Puede ser calculada con la siguiente fórmula (expresada en porcentaje). Promedio de la concentración de la hemoglobina por cada eritrocito.

$$\text{CHCM } (\%) = \frac{\text{HGB } (\text{g/dL}) \times 100}{\text{HCT}}$$

3. **Volumen corpuscular medio (VCM):** es el volumen medio de los glóbulos rojos. Es uno de los parámetros más estables de la biometría hemática, con poca variabilidad (menos del 1%) en el tiempo. Por esta razón, el VCM juega un papel extremadamente

valioso en el monitoreo de las cualidades preanalíticas y analíticas de la muestra. El VCM es leído directamente por el método de instrumentación o es un valor calculado. Si es calculado, la fórmula es la siguiente.

$$\text{VCM (fl)} = \frac{\text{HCT} \times 10}{\text{RBC} (10^6/\mu\text{L})}$$

En el sistema semiautomatizado se calcula dividiendo el HCT/RE (recuento eritrocitario). En sistemas automatizados, el VCM se mide directamente.

4. **Hemoglobina corpuscular media (HCM):** es el contenido medio de b por cada eritrocito. Expresa el peso medio de la Hb en un eritrocito medido en picogramos (10^{-12} gr). Puede ser calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{HCM (pg)} = \frac{\text{Hb (g/L)} \times 10}{\text{RBC} \times 10^6 \text{ células}/\mu\text{L}}$$

5. **Amplitud de distribución de los eritrocitos ADE (RDW- SD):** es expresado como una desviación estándar del valor volumétrico medido al 20% de la altura del histograma, tomado como 100 % pico máximo y expresado en fentolitros. Es útil en algunos casos que es tempranamente anormal en el proceso anémico, mientras que el VCM no es afectado hasta más tarde en dicho proceso. Debido a que muchas anemias (anemias por deficiencia de hierro) se desarrollan con el tiempo, este parámetro puede ser un indicador sensible del cambio del tamaño de los glóbulos rojos antes que se modifiquen los índices eritrocitarios y lleguen a ser evidentemente anormales.

Amplitud de distribución eritrocitaria ADE

Como coeficiente de variación (CV)	12,8 ± 1,2%
Como desviación estándar (DE)	42,8 ± 3,5 fl

Tabla 8. ADE, RDW-SD O RDW- CV

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología Práctica. 2008

6. **Ancho de distribución eritrocitaria (RDW-CV):** es un cálculo matemático que da una visión de la cantidad de anisocitosis (variación en el tamaño) y en algún grado de poiquilocitosis (variación en la forma) en un frotis periférico. El ADE se deriva como sigue: es la amplitud de distribución eritrocitaria expresada como coeficiente de variación (CV) resultado de la medición cuantitativa de la variación del volumen celular. Se refiere al coeficiente de variación del VCM. RDW- CV y RDW-SD reflejan el índice de anisocitosis.

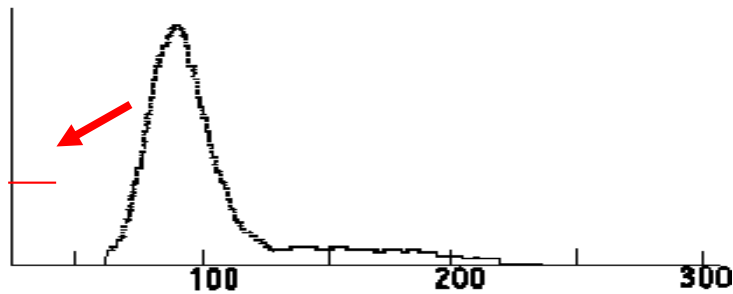


Figura 16. Amplitud de distribución de los eritrocitos.

Fuente: 946986126. Guía 2012 trabajo práctico Hematología

Tabla 8. Valores de referencia parámetros indirectos.

VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
80-100	27-34	31-36

Fuente: 946986126. GUÍA 2012 trabajo Práctico Hematología

7. **Cantidad de hemoglobina de los reticulocitos RET-HE Ó CHR:** mide la cantidad de hemoglobina de los reticulocitos, proporcionando una medida indirecta del hierro funcional disponible para la eritropoyesis en los 3 o 4 días previos. Es de utilidad para el diagnóstico del déficit funcional de hierro, en pacientes tratados con eritropoyetina para tratamiento de anemia asociadas a insuficiencia renal crónica o asociada a quimioterapia. Determina la cantidad de hemoglobina equivalente del reticulocito recientemente producida, monitoriza los diferentes estados de la deficiencia de hierro y permite diferenciar las deficiencias funcionales de las no funcionales.

Es de utilidad en el diagnóstico diferencial entre la anemia por deficiencia de hierro y la anemia por enfermedad crónica. Thomas y col. en estudios de Ret-He y receptor sérico de la transferrina (sTfR) en pacientes con anemia definió cuatro condiciones básicas de los pacientes:

- Personas sanas con reposición de hierro y eritropoyesis normales.
- Paciente con aporte reducido de hierro, pero que no tienen todavía eritropoyesis deficiente en hierro.
- Reducción de la reserva y de los componentes funcionales de hierro con hemoglobinización deficiente de eritrocitos (ferropenia clásica).
- Ferropenia funcional en estado carencial de hierro con reducción de la hemoglobinización de los eritrocitos.

El déficit funcional de hierro se definió para un Ret-He de 28 pg, en base a la distribución de estos valores en controles sanitarios. El sTfR/log ferritina es de 3,2 para la ferropenia sin reacción de fase aguda y 2,0 para la ferropenia combinada con inflamación.

Son factores interferentes una muestra hemodiluida con suero fisiológico o una muestra post-transfusión.

8. **Plaquetocrito (Pct):** expresa el volumen ocupado por las plaquetas en relación al valor total del hematocrito. Valor referencial 12 a 38 %.
9. **Volumen corpuscular de plaquetas (VPM):** el volumen plaquetario medio (VPM), o MPV por sus siglas en inglés, es una medida que describe el tamaño medio de las plaquetas en la sangre. Puede llevarse a cabo como parte de un hemograma completo. Una prueba de VPM mide los tamaños de las plaquetas en una muestra de sangre para determinar la media. Dado que el tamaño promedio de plaquetas es más grande cuando la producción de plaquetas aumenta, los resultados de la prueba VPM se pueden utilizar para inferir sobre la producción de plaquetas en la médula ósea o detectar problemas de destrucción de plaquetas. El valor referencial es 5 a 15 fl.
10. **Amplitud de distribución de plaquetas (PDW):** rango referencial 9 a 16 fl.

Capítulo 5 Coagulación

Introducción

La coagulación sanguínea es el proceso por el que la sangre pasa del estado líquido al estado sólido, evitando que el daño de los vasos sanguíneos provoque pérdidas hemáticas importantes. La coagulación comprende una red compleja de interacciones que involucran vasos sanguíneos, plaquetas y factores de la coagulación; la condición para formar y remover un coágulo depende de fuerzas sinérgicas, al igual que una balanza de equilibrio, la hemostasia se basa en un sistema de pruebas y balances entre la trombosis y la hemorragia que incluyen procoagulantes y anticoagulantes.

La trombosis indica una activación inapropiada del sistema hemostático, de tal forma que cuando disminuyen los anticoagulantes normales presentes en la circulación se forma un coágulo. Si los procoagulantes o factores de coagulación disminuyen, la escala se inclina hacia el sangrado. Las hemorragias o sangrados excesivos pueden producirse por enfermedades o ruptura de vasos sanguíneos, trastornos plaquetarios y anomalías adquiridas y congénitas. La hemostasia detiene el sangrado de un defecto de la pared del vaso y simultáneamente mantiene la fluidez dentro de la circulación.

Bajo condiciones fisiológicas, las propiedades anticoagulantes, profibrinolíticas y antiplaquetarias del endotelio normal mantienen la fluidez. La coagulación se divide en dos sistemas principales: sistema primario y sistema secundario de la hemostasia.

El **sistema primario** de la hemostasia comprende la función plaquetaria y vasoconstricción. El **sistema secundario** incluye a las proteínas de la coagulación, fosfolípidos de las plaquetas y los sustratos que por reacciones enzimáticas delicadamente balanceadas, culminan con la formación de la fibrina y refuerzan la formación del tapón plaquetario hasta que se complete la curación.

La conversión del fibrinógeno soluble en un coágulo de fibrinógeno insoluble se logra por la acción de la trombina, un poderoso coagulante formado a partir de la protrombina, proteína circulante precursora. La disolución del tapón plaquetario y de la malla del coágulo de fibrina se consigue mediante el proceso fibrinolítico o lisis de fibrina.

Cuando una lesión afecta la integridad de las paredes de los vasos sanguíneos, se ponen en marcha una serie de mecanismos que tienden a reducir la pérdida de sangre. Estos mecanismos llamados de "hemostasia" comprenden: a) la vasoconstricción local del vaso, b) el depósito y agregado de plaquetas y c) la coagulación de la sangre.

La capacidad de coagulación de la sangre requiere de la participación de las plaquetas también denominadas trombocitos y de las proteínas denominadas factores de coagulación. Las plaquetas son células de forma ovalada que se fabrican en la médula ósea; la mayoría de los factores de coagulación se produce en el hígado. Los factores de la coagulación responden en forma de compleja cascada, a fin de fortalecer el tapón de plaquetas. Posteriormente, la herida se cicatriza y el tapón de plaquetas se descompone.

Tiempo de protrombina TP

Definición: es una prueba que mide el tiempo que tarda la porción líquida de la sangre en coagularse. Mide la vía extrínseca y común de la cascada de la coagulación. Un coágulo es una masa espesa de sangre que produce el organismo para sellar escapes de sangre a través de heridas, cortes o lesiones a fin de evitar el sangrado excesivo.

Como estudio, evalúa la actividad de cinco factores de coagulación diferentes (I, II, V, VII y X).

Esta prueba determina si los valores de los factores de coagulación son normales y útiles para actuar en circunstancias como hemorragias nasales, sangrado excesivo, para someterse a un procedimiento dental, ante encías que sangran con facilidad, hemorragias excesivas durante el período menstrual, presencia de sangre en la orina, inflamación y dolor en las articulaciones. Incluso, en ausencia de síntomas, se usa esta prueba para garantizar que la capacidad de coagulación de la sangre sea normal, antes de que un paciente se someta a una operación.

Esta prueba puede solicitarse para controlar la capacidad de coagulación sanguínea en pacientes que padecen enfermedades hepáticas o que tienen deficiencia de vitamina K. Es útil para supervisar los efectos del tratamiento con warfarina. En muchos casos los pacientes se ponen en terapia de por vida y la dosis de anticoagulante es monitoreada por el TP y el cálculo de la razón normalizada internacional (INR).

Obtención de los resultados: el tiempo de protrombina se mide en segundos. Los resultados de la prueba del TP se comparan con el tiempo promedio de coagulación de la población sana.

Valores de referencia: 11 a 15 segundos. Cada laboratorio debe establecer los valores de referencia.

El tiempo de coagulación es mayor en personas que toman medicamentos anticoagulantes. La muestra de sangre se procesa utilizando una máquina y los resultados suelen estar disponibles en corto tiempo.

Tromboplastina parcial TTP

Definición: la prueba de tromboplastina parcial (TTP), al igual que la prueba de protrombina, es utilizada para evaluar la capacidad de

la sangre de una persona para formar coágulos. El TTP es la prueba de elección para detectar anormalidades en la vía intrínseca y la común. La prueba mide todos los factores con excepción del factor VII y el XIII.

El TTP se emplea para evaluar los factores XII, XI, IX, X, VIII, V, II (protrombina) y I (fibrinógeno) de la coagulación. Es especialmente útil para supervisar los efectos del tratamiento con heparina (anticoagulante utilizado para tratar o prevenir eventos trombóticos agudos tales como trombosis venosa profunda TVP, embolismo pulmonares EP o síndromes coronarios agudos). La acción de la heparina inactiva los factores XII, XI y IX en la presencia de antitrombina.

Obtención de los resultados: el tiempo de tromboplastina parcial (TTP) se expresa en segundos. Si el resultado del TTP está dentro del intervalo de referencia, se considera que el individuo coagula normalmente, a pesar de que podría existir alguna deficiencia leve de algunos de los factores de la coagulación. Es posible que el TTP no se prolongue hasta que los niveles del factor en cuestión no se reducen hasta el 30% o 40%.

Valor de referencia: 32 a 46 segundos. Cada laboratorio debe establecer los valores de referencia.

Tiempo de hemorragia

El tiempo de sangrado es una prueba que sirve para evaluar la integridad de los vasos, plaquetas y la formación del coágulo. Posee baja sensibilidad y especificidad debido a que se ve afectada por múltiples factores como una mala técnica de realización del examen, uso de antiplaquetarios o enfermedad concomitante de la hemostasia primaria.

Método de Ivy

El método de Ivy es la forma más tradicional de realizar el examen; se procede con una incisión superficial en la piel del antebrazo o el lóbulo auricular y se mide el tiempo que tarda en detenerse la hemorragia. La incisión mide 10 mm de largo y 1 mm de profundidad. El tiempo desde el cual se realiza la incisión y la herida para de sangrar, es conocido como el tiempo de sangría. Cada 30 segundos se utiliza papel filtro para secar la sangre, sin presionar para evitar la alteración del examen. Se considera normal un tiempo de sangría de entre 6 a 8 minutos. Los tiempos superiores a 10 minutos son claramente patológicos.

Método de Duke

Se requiere puncionar al paciente con una aguja especial o lanceta, preferentemente en el lóbulo auricular o yema de los dedos; luego de limpiar el sitio de punción con alcohol, se observa la evolución del sangrado. La punción tiene entre 3 a 4 mm de profundidad. El paciente limpia la sangre con un papel de filtro cada 30 segundos. El test termina cuando cesa la hemorragia. El tiempo usual es de entre 2 y 5 minutos.

Utilidad: en clínica, el tiempo de sangría es un examen de bajo costo que sirve para evaluar la hemostasia primaria. Debido a su baja sensibilidad y especificidad, no se utiliza como examen de diagnóstico, pero sí como herramienta de orientación diagnóstica.

Dímero D

Los dímeros-D son productos de degradación de la fibrina detectados cuando el trombo, en un proceso de coagulación, es proteolizado por la plasmina.

Indicaciones: se usa clínicamente al dímero D si se sospecha de trombosis venosa profunda (TVP), embolia pulmonar (PE), coagulación intravascular diseminada (CID) y sus complicaciones posteriores o bien ante una septicemia. Es objeto de la investigación en el diagnóstico de la disección aórtica. La presencia de dímeros-D la sangre evidencia la presencia de un coágulo sanguíneo. Por lo tanto, un análisis de sangre para medir el índice de dímeros permite detectar la presencia de un coágulo sanguíneo.

Retracción del coágulo

La sangre total que coagula normalmente se retrae de las paredes del recipiente, con lo que se separa el suero transparente y el coágulo. Esta prueba simple se utiliza para confirmar algún problema plaquetario como es la trombocitopenia. Se deja coagular la sangre en un tubo de ensayo sin anticoagulante y se coloca en un baño maría a 37°C para observar el momento en que se retrae el coágulo.

Las plaquetas son importantes en el mecanismo de la retracción del coágulo; así, si esta reacción se altera es indicativo de una disminución del número de plaquetas disminuyen o un funcionamiento plaquetario anormal.

Esta reacción depende también del contenido de fibrinógeno en el plasma, de la relación entre el volumen plasmático con los eritrocitos y de la actividad de un principio acelerador de la retracción del coágulo. La retracción del coágulo depende de la actividad trombo-dinámica de las plaquetas, por lo que se requiere un número mínimo de plaquetas normales y adecuados niveles de Ca⁺⁺.

Método:

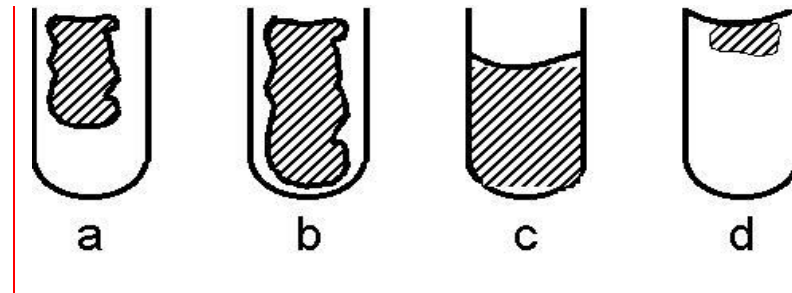
1. Utilizar sangre total sin anticoagulante, colocada en un tubo graduado de vidrio limpio para centrífuga.
2. Dejar el tubo con sangre a baño maría, a 37°C, durante 3 horas. Al cabo de este tiempo, se observa mejor retracción del coágulo, graduando de acuerdo a la magnitud de la retracción por apreciación visual, el tamaño del coágulo retraído y el suero libre en:
 - a) Normal o completa.
 - b) Incompleta.
 - c) No retrae.
 - d) Hiperretráctil.

La retracción comienza a la hora con un máximo a las 24 horas.

Interpretación de resultados: esta prueba depende del número de plaquetas, su actividad funcional y de la concentración de fibrinógeno. Pese a que la retracción del coágulo no se relaciona al 100% con el número de plaquetas (en ciertas condiciones el resultado es normal con un nivel de plaquetas de 30.000/mm³), un aumento importante del fibrinógeno reducirá la retracción por efecto de volumen, mientras que lo opuesto ocurre en casos de hipofibrinogenemia. En la tromboastenia de Glazman (alteración funcional) se observan retracciones incompletas o nulas.

Figura 1. Retracción del coágulo.

- a. Retracción normal o buena.
- b. Retracción deficiente.
- c. Ausencia de retracción.
- d. Hiperretracción.



Tiempo de trombina

EL tiempo de trombina TT mide únicamente la conversión de fibrinógeno a fibrina. Esta conversión se inicia con la adición de trombina al plasma citratado.

Interpretación de resultados: existen varias posibilidades en el resultado.

Prolongación del TT

- Baja concentración de fibrinógeno (menor 200 mg/dl), o ausencia del mismo (hipo o afibrinogenemia). Puede ser de origen congénito o adquirido. Los niveles de fibrinógeno plasmático pueden disminuir en hepatopatías severas, CID o por efecto del tratamiento con estreptoquinasa.
- Presencia de un fibrinógeno anómalo (disfibrinogenemias congénitas o adquiridas).
- Inhibidores de la polimerización de los monómeros de fibrina, productos de degradación del fibrinógeno/fibrina o proteínas plasmáticas anormales.
- Tratamiento o contaminación con heparina.
- Prolongaciones inespecíficas (hiperbilirrubinemia, hipoalbuminemia, hemólisis).
- Aumento muy marcado de fibrinógeno (>800-1000mg/dl).
- Es controvertida su interpretación.

Acortamiento del TT

- Se cita algunas disfibrinogenemias trombóticas.

Los valores aumentados de fibrinógeno no suelen afectar el TT, excepto en situaciones particulares, como por ejemplo pacientes con síndrome nefrótico. Dado que el fibrinógeno es una proteína reactante de fase aguda, su concentración plasmática está aumentada en procesos infecciosos e inflamatorios, cirugías, sepsis, cáncer o aterosclerosis; constituye un marcador de riesgo para eventos vasculares oclusivos.

Los niveles de fibrinógeno aumentan con la edad, masa corporal, embarazo, tabaquismo, estrés y con el uso de anticonceptivos orales.

Valores de referencia: 10 a 16 segundos.

Fibrinógeno

El fibrinógeno es una proteína producida por el hígado y ayuda a detener el sangrado al favorecer la formación de coágulos de sangre. Es el principal sustrato de los sistemas de coagulación y fibrinolítico. Los niveles apropiados del fibrinógeno son necesarios para mantener la hemostasia e inducir la agregación plaquetaria. El fibrinógeno es un reactivo de fase aguda por lo que se incrementa transitoriamente durante procesos inflamatorios, embarazo, estrés, diabetes e ingesta de anticonceptivos orales.

La evaluación de un problema relacionado con el fibrinógeno requiere de una historia cuidadosa del paciente. Por lo general, la disminución en el fibrinógeno se debe a trastornos adquiridos como una enfermedad hepática aguda, enfermedad renal aguda o la CID.

El aumento adquirido del nivel de fibrinógeno se presenta en pacientes con hepatitis, pacientes embarazadas o en las personas con aterosclerosis.

Los trastornos hereditarios del fibrinógeno incluyen: afibrinogenemia y disfibrinogenemia. Estas condiciones son raras y dependiendo de la severidad, se caracterizan por hematomas, hemorragias y equimosis.

Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia. En general, el intervalo de referencia para el fibrinógeno es de 200 a 400 mg/dl.

Coagulómetro automatizado

Son equipos utilizados para determinar cualquiera de las pruebas de hemostasia que utilicen método coagulométrico (TP, APTT, TT, fibrinógeno, factores, etc.). Desde el punto de vista práctico, ahorran tiempo al procesar simultáneamente numerosas muestras, pero fundamentalmente logran altos grados de reproducibilidad.

Básicamente su funcionamiento se basa en dos métodos de detección: óptico (turbodensitometría) o magnético. Los que utilizan el método magnético toman el tiempo que tarda en formarse el coágulo, desde el momento de mezcla hasta que una varillita de metal deja de girar.

Los basados en métodos ópticos utilizan medidas de transmitancia para dar el tiempo de formación del coágulo.

Dentro de las funciones que pueden brindar estos equipos está la incubación de muestras por medio de fuentes secas, ésta se realiza por el tiempo estipulado para cada prueba que debe ser determinado por el operador o bien está estandarizado en el equipo.

Cabe aclarar que en estos equipos se trabaja de modo muy similar al método manual en lo que se refiere a preparación de diluciones y curvas de actividad; la ventaja de los equipos radica en agilizar el trabajo en caso de elevado número de muestras y permitir una mayor reproducibilidad.

Capítulo 6

Tipificación sanguínea

Introducción

Técnica utilizada para identificar el grupo sanguíneo de la persona. El grupo sanguíneo comprende una clasificación de la sangre de acuerdo con las características presentes en la superficie de los glóbulos rojos y en el suero. Las dos clasificaciones más importantes para describir grupos sanguíneos en humanos son los antígenos del sistema ABO y el factor Rh.

Sistema ABO

El sistema ABO fue descubierto por Karl Landsteiner en 1901, convirtiéndolo en el primer grupo sanguíneo conocido; su nombre proviene de los tres tipos de grupos que se identifican: antígeno A, antígeno B y O sin antígeno.

- Personas con sangre tipo A en los glóbulos rojos expresan antígenos de tipo A en su superficie y anticuerpos contra los antígenos B en el plasma.
- Personas con sangre del tipo B en los glóbulos rojos expresan antígenos de tipo B en su superficie y anticuerpos contra los antígenos A en el plasma.
- Las personas con sangre del tipo O carecen de los dos antígenos (A o B) en la superficie de sus glóbulos rojos pero tienen anticuerpos contra ambos tipos, mientras que las personas con tipo AB expresan ambos antígenos en su superficie y no fabrican ninguno de los dos anticuerpos.

Factor Rh

El sistema Rh es el segundo sistema de grupos sanguíneos en la transfusión de sangre humana con 50 antígenos actualmente. En 1940, el Karl Landsteiner descubrió otro grupo de antígenos que lo denominó factores Rhesus (factores Rh), porque fueron descubiertos durante unos experimentos con monos *Rhesus* (*Macaca mulatta*).

Las personas con factores Rhesus en su sangre se clasifican como Rh positivas; mientras que aquellas sin estos factores se clasifican como RH negativas.

Técnica:

1. Se ejecuta en base de una muestra de sangre tomada en un tubo con anticoagulante EDTA o a través del uso de una lanceta, utilizando una placa de vidrio.
2. Se puede realizar la técnica en una tarjeta de gel.

Tubo con anticoagulante EDTA:	<ol style="list-style-type: none">1. Después de la extracción sanguínea, se colocan 3 gotas en una placa de vidrio.2. Se adiciona a cada gota de sangre el reactivo empleado para la identificación respectivamente (Anti A, Anti B, Anti D).3. Con la ayuda de un palito se homogeniza la muestra con el reactivo.4. Se realizan movimientos de rotación durante 30 segundos.5. Se observa la reacción; es positiva cuando se forman aglutinaciones en la homogenización.
Lanceta:	<ol style="list-style-type: none">1. Se pincha con una lanceta el pulpejo del dedo medio, previamente limpio con alcohol.2. En una placa portaobjetos se colocan tres gotas de sangre y se adiciona a cada gota de sangre el reactivo empleado para la identificación respectivamente (Anti A, Anti B, Anti D).3. Con la ayuda de un palito se homogeniza la muestra con el reactivo y luego se realizan movimientos de rotación durante 30 segundos.4. Se observa la reacción; positiva cuando se forman aglutinaciones en la homogenización.
Tarjetas de gel	<p>Se basa en la aglutinación, la cual se produce al entrar en contacto los eritrocitos con los anticuerpos, en un soporte plástico denominado microtubo; existe separación según el tamaño de los eritrocitos aglutinados durante un proceso de centrifugación.</p> <ol style="list-style-type: none">1. Preparar una suspensión de hematíes al 5%.2. Añadir a cada microtubo, 10 µl de la suspensión de hematíes.3. Dispensar en cada microtubo 50 µl o una gota del reactivo A1 y 50 µl o una gota del reactivo B1. Una vez obtenida la muestra de sangre, se colocan 50 µl de sangre en cada uno de los pocillos y se añadir suero o plasma, se centrifuga y finalmente se leen los resultados.

Capítulo 7

Velocidad de sedimentación globular

Introducción

El test de velocidad de sedimentación globular (VSG) mide la sedimentación de eritrocitos en su plasma nativo. No es una prueba específica que puede ser usada para detectar un amplio rango de enfermedades y monitorear el curso evolutivo de ciertas patologías crónicas como son los procesos inflamatorios crónicos (artritis reumatoidea, polimialgia reumática y tuberculosis) o la respuesta a la terapia, por ejemplo con citostáticos, en la enfermedad de Hodgkin, linfomas o mieloma múltiple. Se advierte que, en ocasiones, cuadros tan graves como neoplasias y la cirrosis pueden cursar con una VSG normal.

Constituye uno de los test más utilizados como screening en el laboratorio clínico. Se trata de un método sencillo y que requiere un equipamiento simple.

El mecanismo por el cual se produce la eritrosedimentación no está completamente dilucidado; parece obedecer a interacciones electrostáticas entre la superficie de los glóbulos rojos y diversas proteínas del plasma que favorecen (fibrinógeno y globulinas) o disminuyen (albúmina) la agregabilidad de estas células.

Desde el punto de vista físico, este fenómeno depende de los siguientes factores:

- Tamaño de los GR: la prueba está influenciada por la forma y tamaño de los GR. Como valor diagnóstico resulta poco confiable como índice de enfermedad en casos de anemia falciforme o cuando exista marcada poiquilocitosis.
- Diferencia de densidad entre los GR y el plasma.
- Viscosidad del plasma.
- Temperatura.

Estos factores están vinculados entre sí a través de la ley de Stokes.

La sedimentación ocurre en 3 etapas:

1. Fase de aglutinación de GR con formación de agregados en forma de "pilas de monedas" o rouleaux.
2. Periodo donde los agregados de GR sedimentan a velocidad constante.
3. Etapa final donde la velocidad de sedimentación se enlentece, al mismo tiempo que los GR se acumulan en el fondo del tubo.

La primera etapa o de aglutinación es la más importante, ya que de ella dependerá la velocidad de todo el proceso. Así, cuánto más pequeños sean los agregados, más lentamente se producirá la sedimentación y viceversa.

La velocidad de sedimentación se incrementa por las altas concentraciones de fibrinógeno y otras proteínas de fase aguda e inmunoglobulinas. La albúmina retarda la VSG. El mecanismo por el cual el fibrinógeno y las globulinas facilitan la aglutinación de GR no se conoce fehacientemente, aunque se cree actúan disminuyendo la fuerza de repulsión que normalmente existe entre los glóbulos rojos debido a su carga superficial o potencial zeta.

El potencial zeta es producido por una intensa carga negativa a nivel de la superficie del GR, lo que explica que estas células se mantengan separadas. La intensidad del potencial zeta depende, en gran medida, de la composición proteica del plasma y especialmente de la relación existente entre las concentraciones de albúmina, globulinas y fibrinógeno. Así, mientras la albúmina tiende a aumentar el potencial zeta, las globulinas y sobre todo el fibrinógeno tienden a disminuirlo. Ello obedece a que tanto el fibrinógeno y las globulinas tienen un mayor peso molecular y una conformación menos esférica que la albúmina, lo que aumenta la constante dieléctrica del plasma y reduce el potencial zeta eritrocitario.

La disminución del potencial zeta del GR tiene como consecuencia una mayor tendencia de éstos a agregarse y formar las llamadas “pilas de moneda”. De acuerdo con este mecanismo, el valor normal de la VSG resulta del equilibrio entre las principales proteínas plasmáticas.

Metodología: existen dos métodos comúnmente utilizados para medir la VSG. Los métodos son Westergren y Wintrobe. Ambos métodos poseen limitaciones. El método de Westergren es menos sensible a pequeños aumentos de los factores que causan la sedimentación de GR y puede ser levemente menos confiable como un procedimiento de screening.

El método de Wintrobe puede proporcionar lecturas bajas incorrectas cuando la VSG de Westergren es marcadamente elevada.

Ambos métodos son altamente sensitivos a la relación plasma-GR de la muestra; un bajo hematocrito causa un aumento no específico de la VSG probablemente acelerando la agregación y reduciendo las fuerzas de fricción entre los agregados en sedimentación. Se trataron de aplicar factores de corrección para anemias, pero no resultaron confiables.

Tradicionalmente, la VSG se ha determinado más frecuentemente por el método de Westergren, que fue propuesto como método de referencia por el International Council for Standardization in Hematology (ICSH).

Recientemente se dispone de sistemas semiautomáticos para medir la VSG que emplean soportes especiales y pipetas de material

plástico desechable. Estos sistemas, reproducen exactamente el método de Westergren, se diferencian de éste por su carácter cerrado (la recogida de los especímenes se realiza en tubos al vacío que incorporan una cantidad precisa de anticoagulante) y por el empleo de material complementario (bombas aspirativas) que aumentan la rapidez y precisión del llenado de las pipetas.

Método de Westergren

Es el método de referencia para medir la VSG. Es un método poco reproducible y sometido a diversas variables difíciles de controlar, como es la necesidad de prediluir la sangre. Si se utiliza citrato trisódico dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) preparar una solución acuosa de 32,08 g/l.

Tubo de sedimentación: utiliza tubos de vidrio especialmente diseñados, de una longitud de 300 + 1,5 mm y un diámetro interno de 2,55+0,15 mm. El diámetro del tubo debe ser uniforme (+ 0.05 mm). A lo largo del tubo existe una escala graduada con exactitud en mm, numerada de 200 mm en el fondo hasta 0 mm. Los tubos estandarizados que cumplen las especificaciones de ICSH deben ser aprobados por comités de estandarización en los diferentes países.

Los tubos deben ser cuidadosamente limpiados en acetona-agua. No se recomienda el uso de detergentes o dicromatos para la limpieza.

Los tubos plásticos descartables se fabrican según las especificaciones, los cuales son provistos limpios y secos por el fabricante. Algunos plásticos resultan inadecuados pues unen GR, siendo más susceptibles a problemas de taponamiento. Otros tubos plásticos se manufacturan recubiertos de agentes que eliminan hongos o contienen componentes que interactúan con la sangre.

Gradillas: son dispositivos de sostén diseñados para mantener los tubos en una posición vertical inmóvil. Un dispositivo de burbuja niveladora debe formar parte integral de la gradilla, para asegurar que la posición de los tubos sea vertical dentro de un límite de 1°. La misma debe estar construida de modo tal, que no existan pérdidas de sangre cuando el tubo está colocado en ella.

Técnica:

1. La sangre se obtiene por punción venosa, evitando contaminación con materiales utilizados para la higiene de la piel. La sangre se agrega en proporción de 4 volúmenes de sangre a 1 volumen de solución de citrato de sodio (por ejemplo, 2 ml de sangre con 0,5 ml de anticoagulante). El test debe ser realizado dentro de las 2 horas siguientes a la extracción si la sangre es mantenida a temperatura ambiente o dentro de las siguientes 6 horas si es mantenida a 4°C.
2. Si la sangre citratada se equilibra a temperatura ambiente, se mezcla por inversión repetidas veces y se sumerge un tubo de Westergren en la muestra dejando que la sangre ascienda por capilaridad. El nivel de la sangre se ajusta a cero.

- El tubo es colocado en la gradilla en posición estrictamente vertical a temperatura ambiente (18°C a 25°C), sin exposición a la luz del sol directa, libre de vibraciones y corrientes de aire, manteniéndolo exactamente 60 minutos.
- Una vez transcurrido el tiempo, se lee la distancia entre la superficie del menisco de la columna eritrocitaria y la parte superior de la columna de sangre situada a nivel de la marca cero de la escala graduada. El valor de esta distancia, expresado en mm, corresponde al de la VSG durante la primera hora (mm/hora).

Factores técnicos capaces de modificar la VSG

- Aumento:**
- Desviación de verticalidad de la pipeta.
 - Incremento de la longitud y el diámetro de la pipeta.
 - Elevación de la temperatura ambiente.
 - Dilución incorrecta de la sangre.
- Disminución**
- Reducción del diámetro de la pipeta.
 - Utilización tardía de la sangre (especimen envejecido).
 - Cambio de anticoagulante.
 - Coagulo total o parcial.

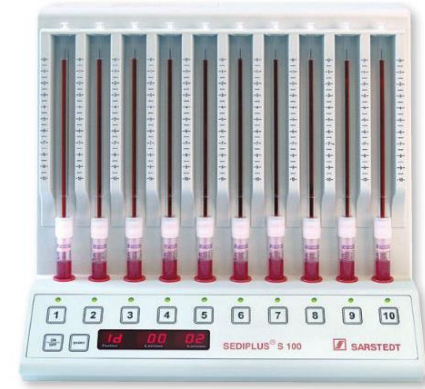


Tabla 1. Valores de VSG.

	Edad (años)	Límite superior de la normalidad (mm/hora)
Niños mayores y jóvenes	0-15	15
Hombres adultos	17-50	10
	51-60	12
	61-70	14
Mujeres adultas	17-50	12
	51-60	19
	61-70	20

Interpretación de resultados: los valores de referencia de la VSG se expresan en mm/h y varían fundamentalmente con el sexo y en cierto grado también con la edad (ver valores de referencia), el ciclo menstrual y las medicaciones (corticosteroides, contraceptivos orales, etc.) La VSG no parece estar influenciada por las ingestas o por los ritmos circadianos. Las determinaciones de la VSG a la segunda hora o a las 24 horas, utilizadas anteriormente, son poco fiables y de escasa significación clínica, por lo que no se recomienda su empleo.

Existen numerosas patologías con alteraciones proteicas del plasma que cursan con modificaciones del valor de VSG. Se observan aumentos de VSG en un amplio espectro de enfermedades, principalmente relacionadas a las proteínas de fase aguda; también en el embarazo normal y el puerperio.

Un 10% de los niños normales presentan VSG aumentadas.

La VSG es especialmente baja (0 a 1 mm) en la policitemia, anormalidades de GR (hemoglobinopatías, esferocitosis hereditaria, anemia falciforme, etc.), hipofibrinogenemia, defectos cardíacos congestivos y ocasionalmente sin causa aparente.

Además de estas condiciones que pueden tender a ocultar una alta VSG, es inusual obtener falsos negativos, por ende, un valor normal de VSG generalmente asegura que no existe enfermedad orgánica.

La VSG es mayor en mujeres que en varones y se correlaciona con las diferencias sexuales en las concentraciones de fibrinógeno. En el embarazo normal, tiene lugar un incremento del fibrinógeno, lo que resulta en un incremento de la agregación de eritrocitos y una sedimentación elevada.

Capítulo 8

Recuento de reticulocitos

Introducción

Los reticulocitos son eritrocitos inmaduros; existen en sangre en una proporción de 5-10:1000 hematíes. Su tamaño es similar a los demás glóbulos rojos y se caracteriza por contener una pequeña cantidad de ARN (ribosomas) formando un retículo granulofilamentoso observable al ser teñido con colorantes llamados vitales (azul brillante de cresilo o azul de metileno nuevo). La cantidad de ARN es tanto menor cuanto más madura sea la célula.

El recuento de reticulocitos es la técnica disponible, más simple para valorar la actividad eritropoyética de la médula ósea. Cuando una anemia se acompaña de un elevado número de reticulocitos circulantes (reticulocitosis) se considera regenerativa, mientras que cuando el número es normal o disminuido se denomina arregenerativa.

En condiciones normales, los reticulocitos permanecen en la médula durante 2 a 3 días y terminan su maduración en 24 horas aproximadamente, una vez ya en la sangre periférica.

El recuento de reticulocitos se realiza en sangre total con anticoagulante (EDTA) y de ser posible en las primeras 24 primeras horas de la extracción si la sangre es conservada conserva a temperatura ambiente y si se la mantiene a 4º C, el recuento puede realizarse hasta 48 horas después.

El recuento puede efectuarse por dos procedimientos:

1. Tinción vital y microscopio óptico.
2. Recuento automatizado.

El método manual adolece de escasa fiabilidad (se reportan coeficientes de variación mayores al 20%), lo que limita su empleo para valorar la capacidad de respuesta medular frente a terapéuticas agresivas, pero sobre todo los errores se deben a la subjetividad y criterio del operador.

Método de la tinción vital (método de referencia)

El procedimiento utiliza los siguientes materiales:

- Colorante: azul de metileno nuevo.

- 1 g cada 100 ml de solución citratada (1 volumen de citrato de sodio 30 g/l y 4 volúmenes de NaCl 9 g/l).
- Sangre total anticoagulada con EDTA.

Técnica:

1. Mediante una pipeta Pasteur se añaden a un tubo de hemólisis tres gotas de solución colorante y tres gotas de sangre total adecuadamente homogeneizada. En caso de valores muy bajos de hematocrito, debe colocarse una doble cantidad de sangre total que de solución colorante.
2. La suspensión sangre/colorante se agita suavemente y se deja a temperatura ambiente durante cinco minutos.
3. Transcurrido este tiempo, se toma una pequeña gota de la suspensión y se extiende sobre un portaobjetos.
4. Una vez seca se puede observar al microscopio con objetivo de inmersión (x100).
5. Es necesario realizar el recuento sobre un mínimo de 1000 eritrocitos. El recuento se efectúa contando en el sitio donde los eritrocitos estén distribuidos homogéneamente. Se cuentan tantos campos como sean necesarios para alcanzar la cifra de eritrocitos requerida, siendo 100 a 125 el número óptimo de hematíes por campo, entre los cuales se distinguen los reticulocitos, para luego expresar el resultado como porcentaje, siendo el cien por ciento el número total de hematíes contados. También se pueden contar 10 campos homogéneos y luego sacar un promedio y se obtiene así el porcentaje.

Si se utiliza esta técnica conviene moverse aleatoriamente por el preparado buscando zonas de distribución homogénea, realizando el recuento cada 2 o 3 campos. Recordar que los campos en los que no se encuentran reticulocitos deben considerarse en el cálculo final. Así por ejemplo para un paciente sano podríamos tener:

$$\frac{(2 + 1 + 0 + 1 + 2 + 1 + 0 + 1 + 2 + 2)}{10} = 1,1 \%$$

Interpretación de resultados: el valor obtenido por la técnica de referencia será válido si se trata de una concentración normal de eritrocitos en sangre total. Por ello, cuando disminuye el número de eritrocitos como suele suceder en la anemia, el valor porcentual debe corregirse según el hematocrito empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Reticulocitos corregidos (\%)} = \text{Reticulocitos observados (\%)} \times \frac{(\text{HCT del paciente \%})}{(\text{HCT normal \%})}$$

El valor de hematocrito normal corresponde al sexo y edad.

Valor corregido: en caso de anemia intensa, el número de reticulocitos circulantes suele ser superior al que corresponde al grado de regeneración eritroblástica. Ello obedece a que la anemia se acompaña siempre de un estímulo eritropoyético compensador, que

facilita una salida precoz de reticulocitos desde la médula hacia la sangre periférica y un acortamiento de su período de maduración intramedular y prolongación de la maduración en sangre periférica, lo que provoca un recuento de reticulocitos falsamente elevado. Este fenómeno se caracteriza por la aparición en el examen morfológico de la extensión de sangre de eritrocitos grandes (macroцитos) y de tonalidad azulada (policromasia). De esta forma puede calcularse otra magnitud de interés clínico denominada índice de producción reticulocitaria (IPR) aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{IPR} = \frac{\text{Reticulocitos del paciente} \times \text{HCT del paciente}}{\text{Período de maduración en días} \times \text{HCT normal}}$$

El factor en condiciones normales es 1 y aumenta 0,5 cada 10% de disminución del HCT. El factor de corrección según HCT: 45% = 1 25% = 2 35% = 1,5 15% = 2,5.

Reticulocitos tinción azul cresil brillante

Un IPR >3 indica aumento de actividad eritropoyética medular (anemia regenerativa), mientras que un IPR <2 indica escasa actividad eritropoyética (anemia arregenerativa).

Se utiliza como colorante el azul brillante de cresilo en iguales proporciones a las indicadas en el método de referencia. La mezcla sangre/colorante se incubará durante 15 minutos a 37°C y luego de este tiempo se realiza el extendido y recuento como se indicó antes.

Recuento automatizado

Los recuentos automatizados de reticulocitos se basan en la combinación de diversos colorantes y fluorocromos con el ARN de los reticulocitos. Tras la unión con el colorante, las células fluorescentes pueden contarse utilizando un citómetro de flujo.

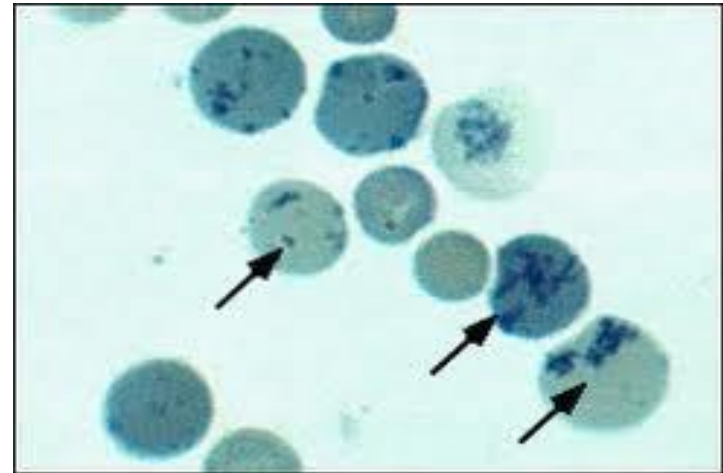


Figura 1. Método de la tinción vital.

Fuente: <http://hemasofi.blogspot.com/2014/10/celulas-sanguineas.html>.

La mayoría de los contadores sanguíneos completamente automatizados incorporan actualmente la capacidad para contar reticulocitos, de forma que ya no es necesaria la utilización de un contador único para reticulocitos ni el uso de un citómetro de flujo de uso general. El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) en colaboración con el ICSH, ha publicado una norma internacional para este método. Los colorantes utilizados en los diferentes sistemas incluyen la auramina O (Sysmex), el naranja de tiazol (ABX) y el CD4K 530 (Abbott), así como colorantes no fluorescentes como la oxazina 750 (Bayer-Technicon) y el tradicional nuevo azul

de metileno (Beckman-Coulter, Abbott). Tras la tinción, es necesario separar los reticulocitos de los hematíes no teñidos y como los colorantes también se combinan con el ADN de las células nucleadas, por lo que deberá excluirse también estas células. El umbral para esta exclusión está determinado por la intensidad de la fluorescencia y el tamaño de las partículas. Aunque la separación entre reticulocitos y hematíes maduros no siempre está bien delimitada, los recuentos automatizados de reticulocitos se correlacionan adecuadamente con los recuentos manuales, sin embargo, los recuentos absolutos pueden diferir, ya que los recuentos automatizados dependen de las condiciones de la incubación y del método de calibración del instrumento.

La precisión es superior a la técnica de recuento manual, ya que el equipo realiza una valoración de un mayor número de células y se elimina el elemento subjetivo del operador, en especial, el reconocimiento de reticulocitos tardíos, la inclusión de algunos leucocitos, plaquetas y con menor frecuencia los cuerpos de Howell-Jolly o parásitos del paludismo como que fueran reticulocitos, lo que constituyen fuentes potenciales de inexactitud. Los recuentos automatizados de reticulocitos son estables en sangre almacenada durante 1 o 2 días a temperatura ambiente o hasta 3 a 5 días a 4°C.

Variaciones patológicas

Disminución de reticulocitos (reticulocitopenia):

- Aplasia medular.
- Anemias carenciales intensas (megaloblástica y ferropénica).
- Anemias inflamatorias.

Aumento de reticulocitos (reticulocitosis):

- Período neonatal.
- Anemias hemolíticas.
- Anemias poshemorrágicas.
- Anemias carenciales en fase de tratamiento.
- Mieloptisis (infiltración neoplásica en la médula ósea).
- Mielofibrosis idiopática.
- Embarazo.

Capítulo 9

Alteraciones cuantitativas de la fórmula leucocitaria

Alteraciones cuantitativas

Se refiere a una variación en la cantidad de los diferentes tipos leucocitos o bien a variaciones en el recuento total. Se evalúa mediante conteo total de leucocitos y/o conteo diferencial de cada uno de ellos. Pueden deberse a trastornos benignos o malignos ocasionados por transformación neoplásica de células progenitoras. Los trastornos benignos pueden ser adquiridos o hereditarios.

Tabla 1. Fórmula leucocitaria normal. Valores de referencia para adultos sanos.

Células	Valor relativo %	Valor absoluto ($\times 10^9/l$)
Cayados	0 - 2	0 - 0,2
Neutrófilos segmentados	50 - 70	2,3 - 6,5
Eosinófilos	1 - 4	0,05 - 0,45
Basófilos	0 - 1	0 - 0,1
Linfocitos	20 - 40	1,5 - 4,0
Monocitos	3 - 8	0,1 - 0,8

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008

Reacción leucemoide: es una reacción benigna de leucocitos caracterizada por leucocitosis con muchos precursores inmaduros de leucocitos circulantes. Esta respuesta puede ser linfocítica, eosinofílica o neutrofílica. Puede producir un cuadro sanguíneo indistinguible de la leucemia mielocítica crónica.

Es transitoria y desaparece cuando el estímulo desencadenante se elimina, por ejemplo extirpación del tumor o control de la infección. Como sucede con la leucemia, la persona con una reacción leucemoide presenta proliferación desorganizada de glóbulos blancos inmaduros en la sangre y en la médula ósea. La reacción leucemoide puede producir un cuadro sanguíneo indistinguible de la leucemia mielocítica crónica. En general, la anemia, trombocitopenia o trombocitosis que se encuentra clásicamente en la leucemia, no están presentes en una reacción leucemoide y si se presentan vuelve difícil el diagnóstico diferencial. Cuando esta situación sucede los estudios cromosómicos y la fosfatasa alcalina (FAL) pueden ayudar a diferenciar las dos patologías.

Se considera como reacción leucemoide valores entre $20,0$ a $50,0 \times 10^9/l$.

Reacción leucoeritroblástica: se caracteriza por la presencia de eritrocitos nucleados y una desviación a la izquierda en los neutrófilos de sangre periférica. Se relaciona con más frecuencia con mieloptisis que es la proliferación de elementos anormales de la médula ósea; se observa también en casos de hemorragia intensa o en anemias hemolíticas como la eritroblastosis fetal.

Reacción leucemoide neutrofílica: se encuentra aumento de PMN, acompañados de mielocitos y metamielocitos. Entre las causas se cita a:

- Neoplasias broncopulmonares y gástricas.
- Tumores malignos de mama y próstata.
- Algunas infecciones bacterianas: osteomielitis, tuberculosis.

Alteraciones fisiológicas: alteraciones desencadenadas por causas diferentes a la enfermedad subyacente del paciente, son transitorias y no necesitan tratamiento puesto que no constituyen un parámetro de enfermedad. Puede presentarse por:

- Edad.
- Embarazo.
- Estrés.
- Ejercicio intenso.
- Raza (algunas personas de raza negra tienen tendencia a leucopenia).

Alteraciones patológicas

Leucocitosis: aumento mayor a $10,0 \times 10^9 / l$ y puede ser de diferentes clases: neutrofilia, eosinofilia, basofilia, linfocitosis, monocitosis.

- **Eosinofilia:** aumento mayor a $0,5 \times 10^9 / l$; este puede verse en infecciones por parásitos metazoarios, trastornos alérgicos, cáncer y estados inflamatorios crónicos. Se observa también en el síndrome de Loeffler el cual parece ser producido por una reacción alérgica. Una causa común es la migración del parásito *Ascaris lumbricoides* a través del tracto respiratorio. Otros parásitos de la familia de los áscaris también pueden producir el síndrome. Entre las posibles causas adicionales se incluye la alergia a medicamentos, por ejemplo sulfonamida. También se puede presentar en coexistencia con tumores sólidos.
- **Basofilia:** aumento mayor a $0,1 \times 10^9 / l$. El aumento absoluto de basófilos está vinculado a reacciones de hipersensibilidad inmediata y afecciones mieloproliferativas crónicas (LMC). Se observa también en enfermedades inflamatorias del intestino, el mixedema y después de la exposición a la radiación.

- **Linfocitosis:** aumento mayor a $4 \times 10^9/l$; este incremento absoluto en el número de linfocitos generalmente responde a una infección viral. Un marcado incremento en el número de linfocitos puede estar asociado a una leucemia linfática crónica.
- **Monocitosis:** aumento mayor a $0,8 \times 10^9/l$; se asocia a períodos largos y crónicos de infección bacteriana (brucelosis, tuberculosis, fiebre tifoidea). Se presenta en la etapa de recuperación de las infecciones agudas. Otras causas son leucemia monocítica y enfermedades del colágeno.

Leucopenias; disminución menor a $4,0 \times 10^9/l$ y puede ser de diferentes clases: neutropenia, eosinopenia, monocitopenia, linfopenia.

- **Neutropenias:** recuento menor a $2,3 \times 10^9/l$, debida a menor producción medular subsecuente a aplasia medular, agentes citotóxicos que deprimen la división celular (sulfamidas, cloranfenicol) o hematopoyesis ineficaz. Otra causa es el exceso de la destrucción de GR por anticuerpos antineutrófilos posterior a la administración de medicamentos como la fenotiazina. Se observa también en enfermedades virales, bacterianas y protozoarias (paludismo, tifo) en fase inicial de la infección; la salida de los PMN a los tejidos es mayor que la producción medular (gran demanda tisular).
- **Eosinopenia:** valores absolutos menores a $0,05 \times 10^9/l$; esta disminución es difícil de establecer debido a su bajo recuento. La ACTH aumenta los PMN circulantes pero disminuye los eosinófilos circulantes. Se presenta en situaciones de estrés agudo, reacciones inflamatorias y luego de la administración de glucocorticoides. Una infección bacteriana puede causar disminución debido a una marginación creciente y a la migración de estas células a los tejidos, pero la recuperación se puede acompañar de eosinofilia leve.
- **Monocitopenias:** los valores absolutos son menores a $0,1 \times 10^9/l$. Se encuentra en trastornos de las células progenitoras como en la anemia aplásica, leucemias, posterior a una terapia con glucocorticoides y en la fase inicial de procesos infecciosos.
- **Linfopenias:** los valores absolutos se encuentran bajo $1,5 \times 10^9/l$. Se origina por falla en la producción, exceso en su destrucción o pérdidas celulares a través de los conductos linfáticos del intestino. Las linfopenias por defectos en la producción son característica de algunas IDP, tales como: inmunodeficiencia severa combinada, síndrome de DiGeorge completo, hipoplasia cartílago pelo, inmunodeficiencia común variable y SIDA.

Capítulo 10

Alteraciones cualitativas de la fórmula leucocitaria y alteraciones nucleares

Alteraciones cualitativas y alteraciones nucleares

Anomalia de Pelger Hüet: trastorno nuclear hereditario autosómico dominante o adquirido debido a quimioterapia, síndromes mieloproliferativos agudos o crónicos, quemaduras, reacciones a fármacos e infecciones. Existe falla en el desarrollo del núcleo durante la diferenciación terminal; el núcleo tiene forma de nuez o maní. Además de detecta hipercondensación de la cromatina e hiposegmentación nuclear. No se pierde la función celular.

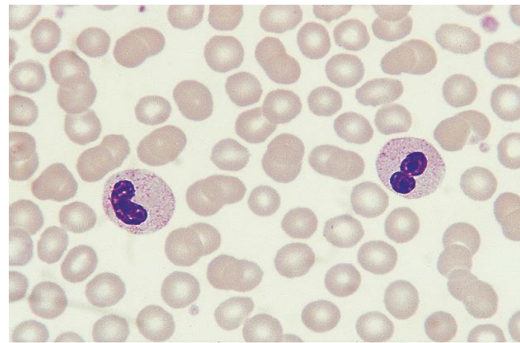


Figura 1. Anomalia de Pelger Hüet.
Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Hipersegmentación nuclear: trastorno hereditario autosómico dominante o adquirido. Se debe a una anomalía en la maduración del núcleo (síntesis de DNA). Se presentan polimorfonucleares con 6 o más lóbulos. Son células de mayor tamaño que las normales. Se observa asociada a la eritropoyesis megaloblástica, infecciones crónicas o déficit de vitamina B12, folatos, etc.

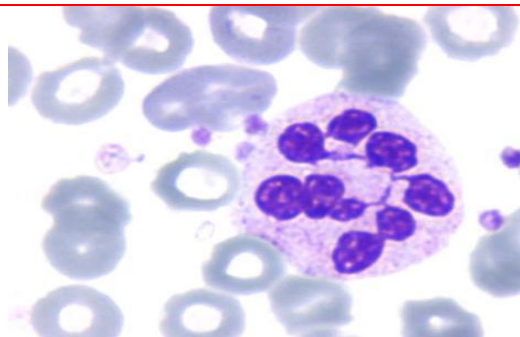


Figura 2. Hipersegmentación nuclear.
Fuente:
<http://hemasofi.blogspot.com/2014/10/celulas-sanguineas.html>

Alteraciones citoplasmáticas

Síndrome de Chediak–Higashi: trastorno autosómico recesivo caracterizado por albinismo parcial, gránulos lisosómicos gigantes en la mayoría de las células granulosas (aunque también se observan en linfocitos y monocitos) y mayor susceptibilidad a infecciones. Se observan células sanguíneas anormales en los frotis sanguíneos de rutina. La enfermedad se diagnostica generalmente en niños. Existen diversas anomalías en los neutrófilos incluyendo neutropenia moderada, reducción en la quimiotaxis de neutrófilos. Además, en estudios microbicidas, se observa que los gránulos primarios gigantes se degranulan con lentitud y por lo tanto se retarda la muerte de las bacterias fagocitadas.

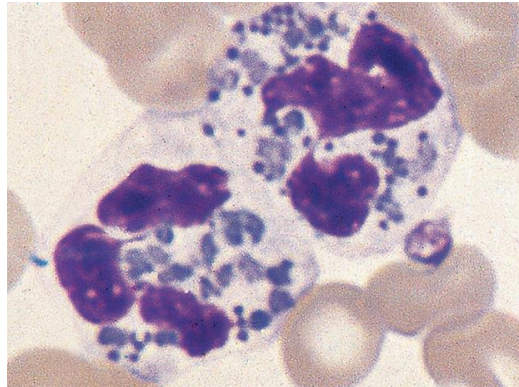


Figura 3. Síndrome de Chediak – Higashi.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Anomalia de Alder Reilly: trastorno de tipo autosómico. Presencia de gránulos azurófilos agrupados en racimos en el citoplasma de granulocitos, monocitos y linfocitos. Se diferencian de las granulaciones tóxicas ya que se presentan en otras células diferentes a los neutrófilos y la ausencia de vacuolas tóxicas. Está asociada a mucopolisacaridosis.

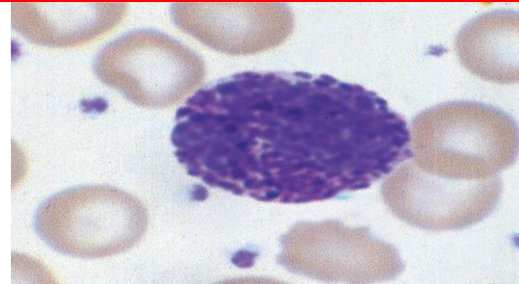


Figura 4. Anomalia de Alder Reilly.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Anomalia de May–Hegglin: trastorno autosómico dominante asociado a hemorragias leves, macroplaquetas con escasos gránulos y trombocitopenia. Se caracteriza por la presencia en neutrófilos segmentados de unos cuerpos de inclusión similares a los cuerpos de Döhle, visualizados de un color azul pálido distribuidos en todo el citoplasma (no en la periferia de la célula).

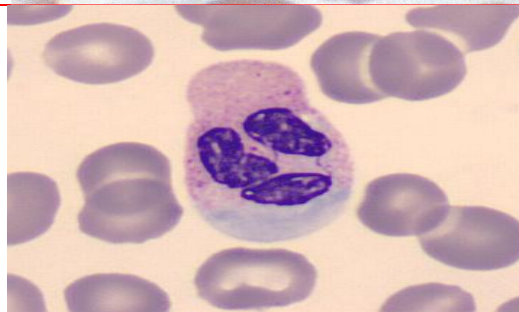


Figura 5. Anomalia de May – Hegglin.

Fuente:
http://www.gechem.net/php/index.php?option=com_kunena&view=topic&catid=10&id=2088&Itemid=197

Cuerpos de Döhle: no son exclusivos de los neutrófilos; se los encuentra en el citoplasma de los monocitos. Son inclusiones redondeadas basófilas únicas o múltiples que se depositan en la periferia de las células y son poco nítidas. La presencia de estas inclusiones indica hiperactividad celular. Acompaña a condiciones tóxicas tales como fiebre escarlatina, sepsis, quemaduras, embarazo y tuberculosis.

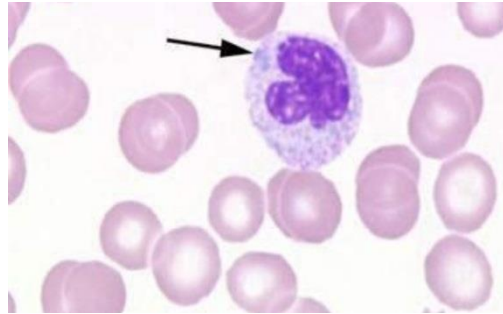


Figura 6. Cuerpos de Döhle.

Fuente:

http://www.gechem.net/php/index.php?option=com_kunena&view=topic&catid=10&id=2088&Itemid=197

Granulaciones tóxicas: son gránulos hipertrofiados que le dan un aspecto hipergranular al citoplasma de los neutrófilos, que junto con las vacuolas y los cuerpos de Döhle se encuentran en condiciones tóxicas como infecciones, septicemia o quemaduras. Son gránulos primarios que debido a algún desbalance en la maduración del neutrófilo no lograron ser eliminados eficazmente.

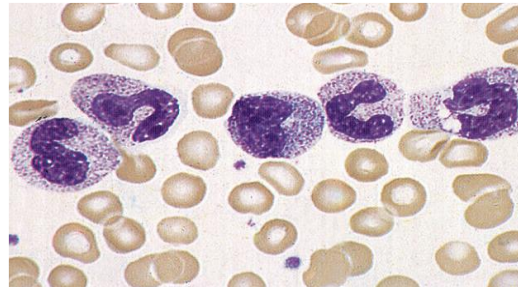


Figura 7. Granulaciones tóxicas.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Cuerpos o bastones de Auer: son inclusiones intracitoplasmáticas en forma de varilla o bastón que se observan en mieloblastos, promielocitos y monoblastos.

Se cree son gránulos azurófilos que se fusionan y tienen afinidad por la eosina. Se encuentran en la leucemia mieloide aguda y durante la crisis blástica de la leucemia mieloide crónica.

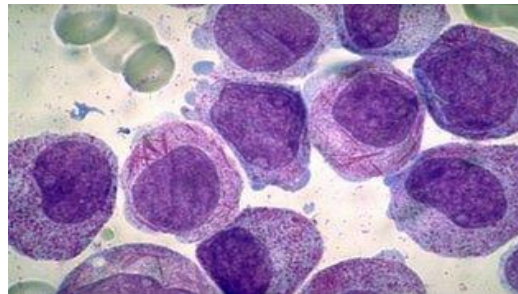


Figura 8. Cuerpos o bastones de Auer.

Fuente:

http://analisisclinicos.blogspot.com/2005_10_01_archive.html

Vacuolas: pueden presentarse en el citoplasma de neutrófilos tóxicos, monocitos, eosinófilos y menos frecuentemente en linfocitos. Al microscopio óptico se observan como puntos blancos en sacabocado. En frotis realizados a partir de muestras mantenidas en tubos lilas, estas vacuolas se observan en muestras envejecidas por fagocitosis de las sales del anticoagulante, por lo tanto para su confirmación resulta imprescindible el extendido de punta de aguja.

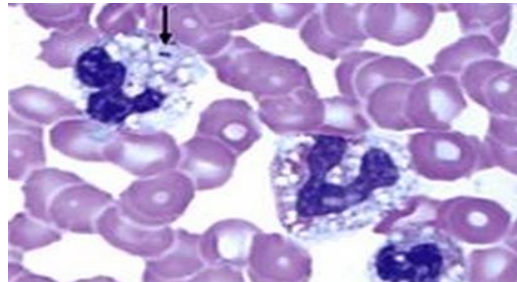


Figura 9. Vacuolas.

Fuente:

http://www.gechem.net/php/index.php?option=com_kunena&view=topic&catid=17&id=1944&Itemid=197

Linfocitos activados: llamados también células linfomonocitoides, linfocitos activados, inmunocitos, etc. Miden de 15µm a 30µm, poseen núcleo irregular indentado, excéntrico y puede observarse nucléolos. El citoplasma es amplio, de color azul tenue o intenso y puede poseer gránulos azurófilos y vacuolas. Estas células acompañan a la mononucleosis infecciosa, hepatitis viral, herpes zoster y enfermedades autoinmunes. Normalmente se encuentran hasta en un 5%.

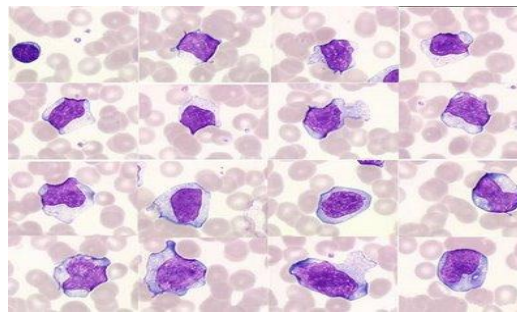


Figura 10. Linfocitos activados.

Fuente:

<http://cardioapuntos.blogspot.com/2008/07/hematologa-curiosidades-linfocitos.html>

Capítulo 11

Alteraciones de la serie roja

Hematíes normocíticos–normocrómicos

Son discos cuya biconcavidad hace que aparezcan con cierta palidez central. Miden aproximadamente de 7,2 μm a 7,4 μm .

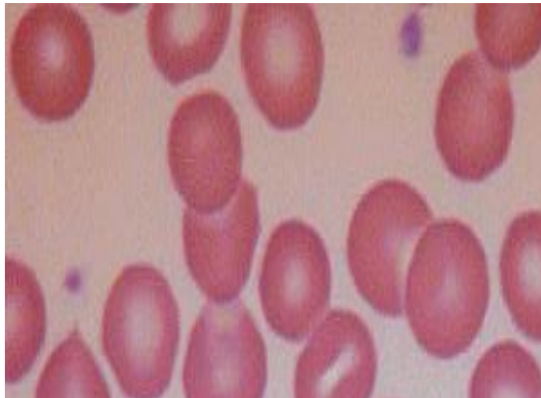


Figura 1. Hematíes normales.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Alteraciones serie roja. Anemias

Anisocitosis: alteraciones en tamaño.

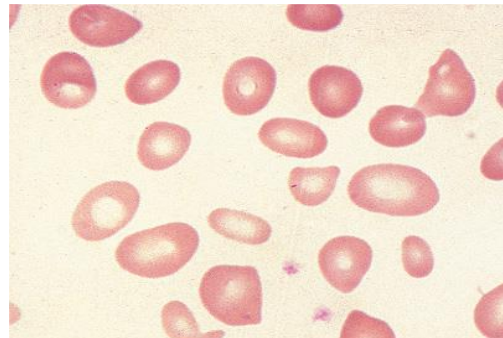


Figura 1. Anisocitosis.

Fuente:

<https://medicinainterna.wikispaces.com/Anemias>.

Poiquilocitosis: alteraciones en su forma.

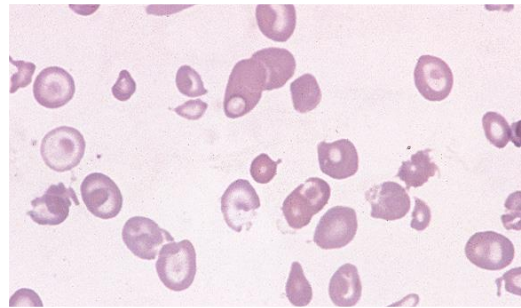


Figura 2 .Poiquilocitosis.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología Práctica. 2008.

Anisocromía: alteraciones en el color.

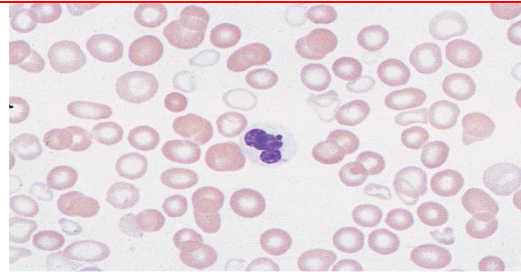


Figura 3. Anisocromía.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Alteraciones en el tamaño

Macroцитos: hematíes presentan un tamaño superior al normal (más de 9 μm) y su expresión máxima es el megalocito. Suelen aparecer en la anemia megaloblástica debida a déficit de vitamina B12 o ácido fólico. Se suele observar cuando existe aumento de la actividad eritropoyética, como un mecanismo de compensación a la pérdida de los hematíes, sea por anemia severa o hemorragias. En la sangre periférica se pueden observar como hematíes grandes policromatófilos o reticulocitos.

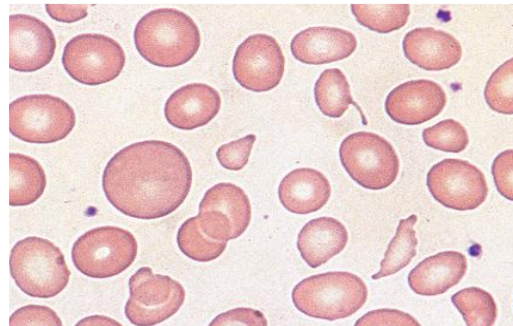


Figura 4. Macrocyto.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Microcitos: hematíes que presentan un tamaño inferior al normal (menos de 6 μm) y se encuentran en pacientes con anemia ferropénica y talasemias.

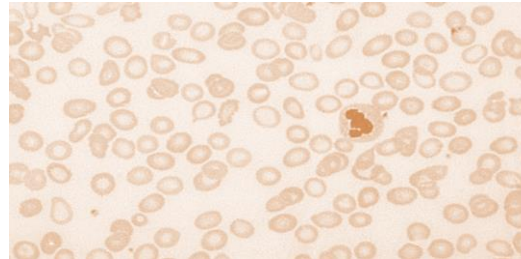


Figura 5. Microcitosis.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Alteraciones en la forma

Esferocitos: son hematíes esféricos, no son bicóncavos; presentan un diámetro inferior al normal pero más grueso. Su vida media es de 14 días, producen taponamiento de vasos sanguíneos. Se encuentran en la esferocitosis hereditaria o enfermedad de Minkowski-Chauffard (defecto congénito de la membrana eritrocitaria). También pueden ser adquiridos por factores extraeritrocitarios (autoanticuerpos, quemaduras extensas, etc.)

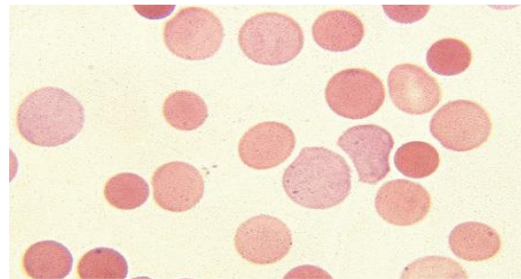


Figura 6. Esferocitos.

Fuente:

<https://medicinainterna.wikispaces.com/Anemias>

Células diana o target cells: en la región central presentan un área con mayor contenido hemoglobínico (zona densa). La interfase entre la membrana celular y el centro es transparente. Se encuentran en hemoglobinopatías (HbC), talasemias, anemia ferropénica y en algunas hepatopatías crónicas con aumento de colesterol y fosfolípidos.

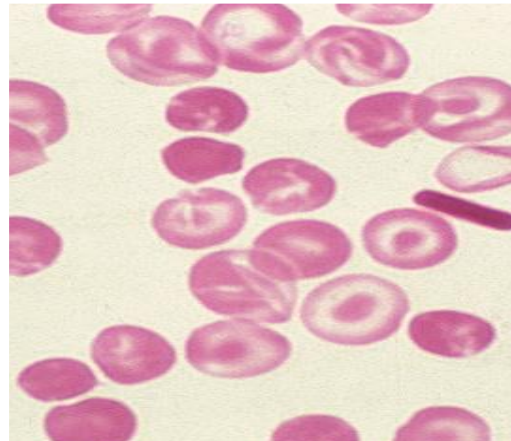


Figura 7. Células diana.

Fuente:

<https://medicinainterna.wikispaces.com/Anemias>

Eliptocitos: hematíes son alargados (ovalocitos). Se encuentran en la eliptocitosis hereditaria. Se produce por una alteración congénita de la membrana del hematíe, aunque puede ser adquirida en caso de una anemia megaloblástica, ferropénica o arregenerativa.

Equinocitos: hematíes presentan membrana ondulante e irregular. Se encuentran en algunas anemias hemolíticas. Este fenómeno puede ser inducido *in vitro* exponiendo los hematíes a una solución hipertónica. También se pueden encontrar en pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC), hepatopatías, déficit de piruvato kinasa (PK), etc.

Acantocitos: los hematíes poseen prominencias en la membrana eritrocitaria más aguzadas (alargadas) y distribuidas irregularmente. Se encuentran en la acantocitosis que se caracterizan por la ausencia de lipoproteínas plasmáticas. También pueden encontrarse en pacientes con hepatopatías, dislipidemias, hipotiroidismo, etc.

Dacriocitos: hematíes en forma de lágrima. Se encuentran en la anemia ferropénica, anemia megaloblástica y talasemia. También se encuentran en situaciones en las que la médula ósea padece alguna patología severa como son síndromes mielodisplásicos (SMD), síndromes mieloproliferativos (MFI), etc. y en esplenomegalia.

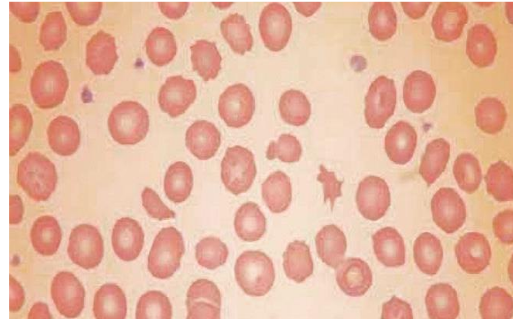


Figura 8. Equinocitos.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

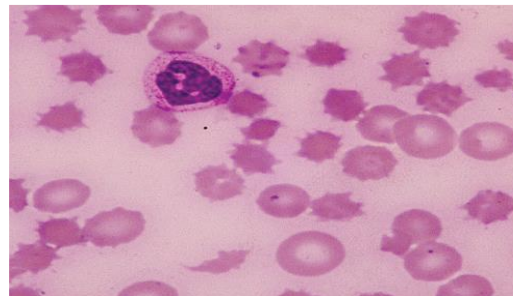


Figura 9 .Acantocito.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

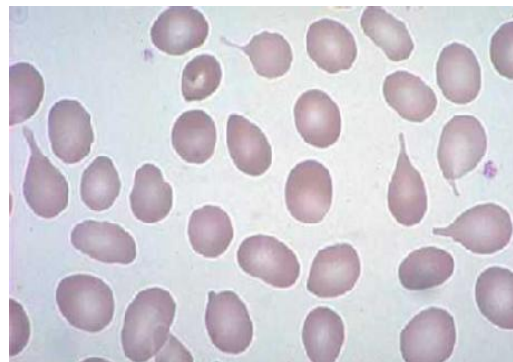


Figura 10. Dacriocito.

Fuente:
<https://medicinainterna.wikispaces.com/Anemias>

Esquistocitos: son fragmentos hemáticos. Se encuentran en anemias hemolíticas microangiopáticas, síndrome urémico hemolítico (SUH), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), quemaduras, etc.

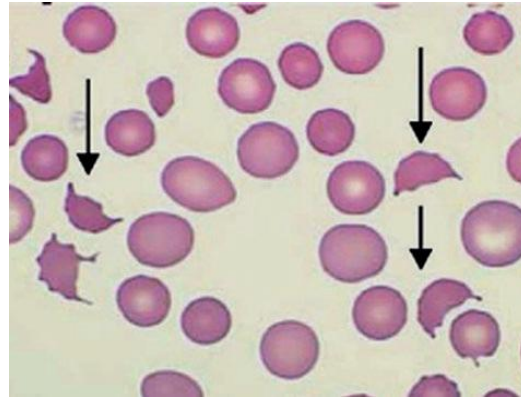


Figura 11. Esquistocitos.

Fuente:

<https://medicinainterna.wikispaces.com/Anemias>.

Estomatocitos: hematíes que en lugar de una depleción central clara tienen una banda pálida central que les da un aspecto de boca. Se hereda como carácter autosómico dominante. Esta enfermedad es causada por anomalía hereditaria de la membrana eritrocitaria. También se pueden encontrar en pacientes con hepatopatías y dislipidemias.

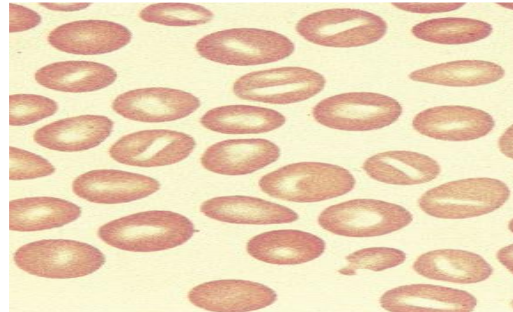


Figura 12. Estomatocito.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología Práctica. 2008

Drepanocitos: son hematíes con HbS precipitada. Su apariencia es propia del estado homocigoto de la hemoglobina S, aunque también se puede presentar en estados de heterocigosis.

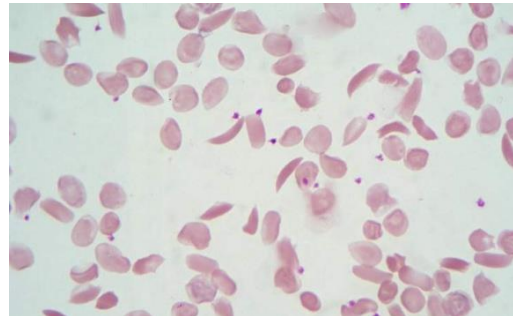


Figura 13. Drepanocitos.

Fuente:

<https://medicinainterna.wikispaces.com/Anemias>

Alteraciones de color: se observan diferentes tonalidades de color de los hematíes dependiendo del contenido hemoglobínico u otros.

Hipocromía: son hematíes con disminución del contenido de la hemoglobina y dependiendo de la cantidad de este pigmento se observan a los hematíes con diferentes caracteres de color. Aquí están incluidos los **anulocitos**, que son hematíes en forma de anillo en los que solo la membrana eritrocitaria está coloreada y que se traduce en una hipocromía de grado severo (+++).

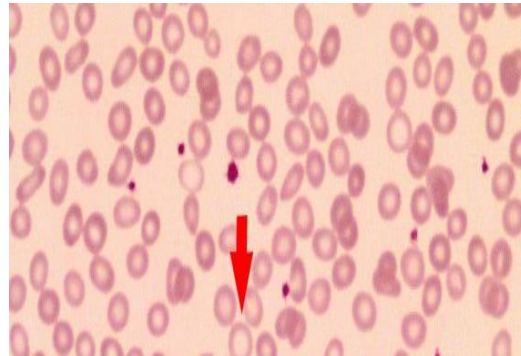


Figura 14. Hipocromía.

Fuente:

<http://hemasofi.blogspot.com/2014/10/celulas-sanguineas.html>

Pseudohipercromía: son hematíes ávidos de hemoglobina. Pueden encontrarse en enfermedades como policitemia vera o policitemia fisiológica y en la esferocitosis hereditaria.

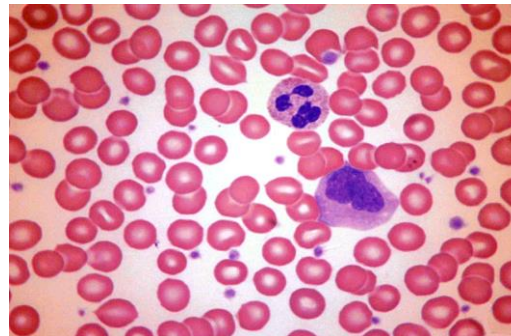


Figura 15. Hipercromía.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Policromatofilia: presencia de hematíes con tonalidad (azul y rojo) morada. Se le relaciona con inmadurez celular, células nucleadas, presencia de reticulocitos, macrocitos, etc. Se debe a la elevada cantidad de ARN en el interior del glóbulo rojo.

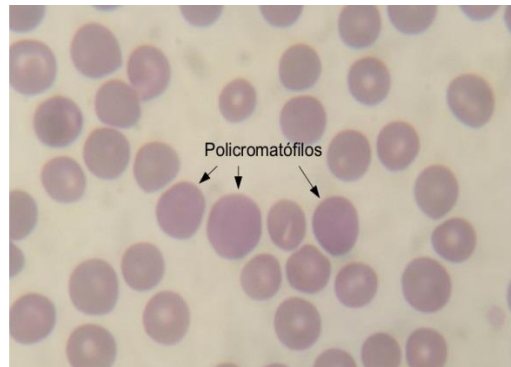


Figura16. Policromatofilia.

Fuente:<http://cardioapuntes.blogspot.com/2008/07/hematologa-curiosidades-linfocitos.html>

Anisocromía: hematíes con diferentes tonalidades de color, hipocrómicos, hiperocrómicos, normocrómicos y policromatófilos. Se encuentran en ciertas anemias refractarias.

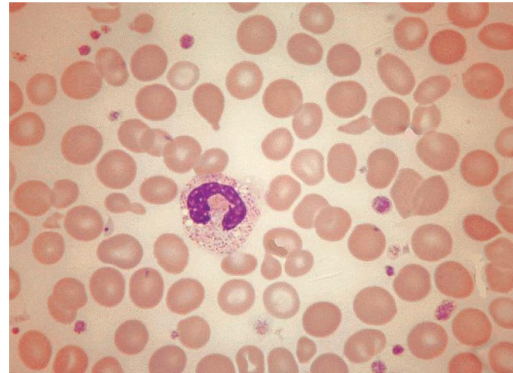


Figura 17. Anisocromía.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Inclusiones anormales

Punteado basófilo: son gránulos basófilos presentes en el citoplasma del hematíe; indica alteración de la eritropoyesis más que un aumento de la misma. Se produce en enfermedades sanguíneas como talasemia, anemias megaloblásticas, infecciones, hepatopatías, intoxicación por plomo y otros metales pesados, hemoglobinas inestables y deficiencia de pirimidina-5'-nucleotidasa. Actualmente el consumo de ciertos fármacos también puede producir este fenómeno.

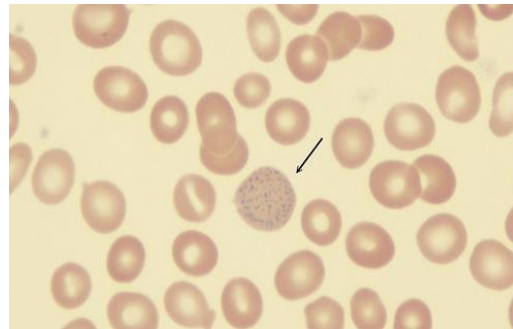


Figura 18. Punteado basófilo.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Cuerpos de Heniz: son formaciones redondeadas de hasta 3 μm de diámetro, localizadas habitualmente en la periferia de la célula. Se observan con colorantes para reticulocitos. Son abundantes en sujetos esplenectomizados.

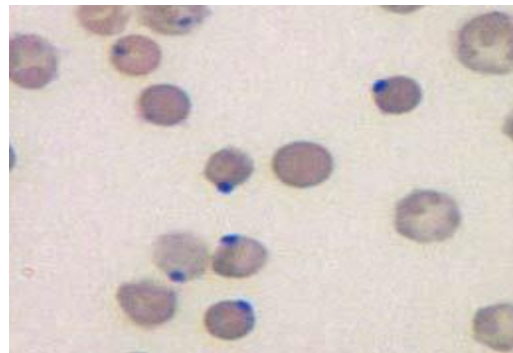


Figura 19. Cuerpos de Heniz.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Anillos de Cabot: se cree son restos de membrana nuclear eritroblástica o restos después de una mitosis anormal. Se observan en forma de anillo u ocho invertidos. Pueden ser precipitados de ARN o proteína. Carece de importancia diagnóstica. Su presencia indica severas signos de diseritropoyesis.

Cuerpos de Howel-Jolly: son restos de cromatina nuclear, que resultan de la pérdida del núcleo por parte del eritroblasto ortocromático hasta la conversión del hematíe. Se les considera signos de regeneración celular.

Pueden observarse (habitualmente aislados) en un pequeño porcentaje de hematíes en la anemia perniciosa. Las células que los contienen aparecen habitualmente luego de la esplenectomía y cuando se ha producido una atrofia esplénica.

En general, solo se encuentran unas cuantas células de este tipo, pero pueden ser numerosas en los casos de enfermedad celiaca en donde existe atrofia esplénica y una deficiencia de folato concomitante.

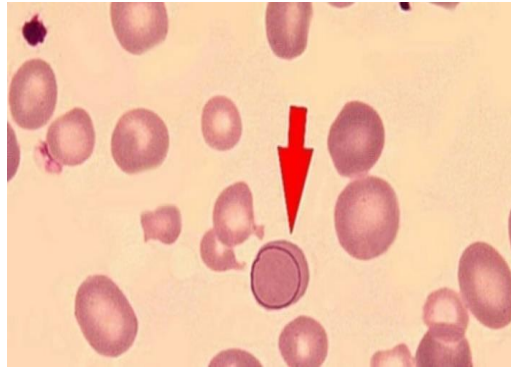


Figura 20. Anillos de Cabot.

Fuente:

<https://www.flickr.com/photos/64061910@N02/galleries/72157626979440606/>

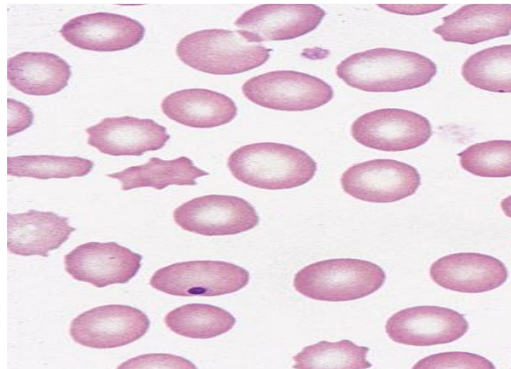


Figura 21. Cuerpos de Howel-Jolly.

Fuente: Dacie y Lewis. Hematología práctica. 2008.

Cuerpos de Pappenheimer: son pequeñas inclusiones eritrocitarias basófilas (casi negras) dispuestas periféricamente. Habitualmente, solo existe una pequeña cantidad en el interior de la célula. Están formados por hemosiderina y su presencia se relaciona con una sobrecarga de hierro y con hipoesplenismo. A veces, se encuentran en la mayoría de los hematíes circulantes. Su naturaleza puede confirmarse por medio de una tinción de Perls.

Corresponden a los gránulos sideróticos de los siderocitos y nunca se encuentran en grandes cantidades en al interior de las células, como el clásico punteado basófilo. Sin embargo, en una sola célula se pueden encontrar ambos elementos, es decir, el punteado basófilo y los cuerpos de Pappenheimer. Con la tinción de Perls, los primeros de estos gránulos se tiñen de rosa mientras que los últimos lo hacen de azul.

Siderocitos: son hematíes con contenido de hierro libre no hemoglobínico de color verde azulado. Los glóbulos rojos circulantes poseen gránulos azulados en la tinción de Perls (para hierro).

Las granulaciones se deben a la presencia de hierro no hemoglobínico; normalmente representan al 0,3% de los eritrocitos. Se detectan en anemias sideroblásticas y en menor grado luego de una esplenectomía.

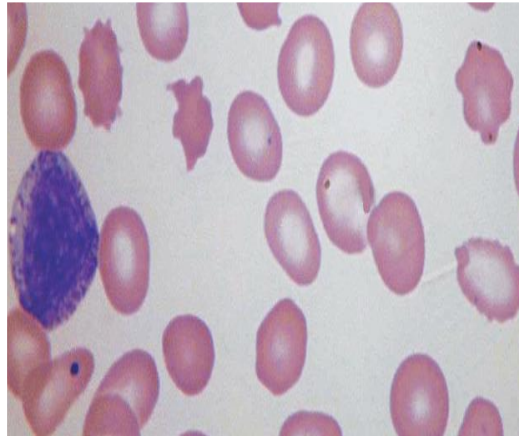


Figura 22.1 Cuerpos de Pappenheimer.

Fuente:

<https://www.flickr.com/photos/64061910@N02/galleries/72157626979440606/>

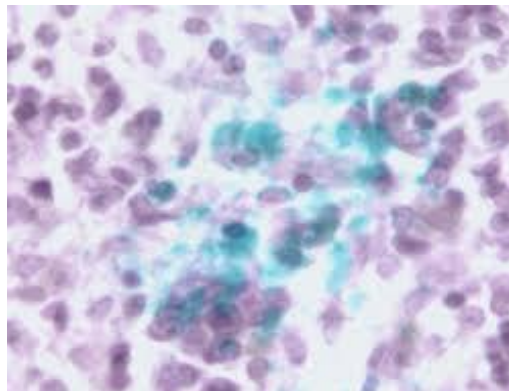


Figura 23. Siderocitos.

Fuente:<http://cardioapuntes.blogspot.com/2008/07/hematologia-curiosidades-linfocitos.html>

Gránulos de Shuffner: gránulos que presentan algunos hematíes en caso de parasitismo por *Plasmodium vivax*.

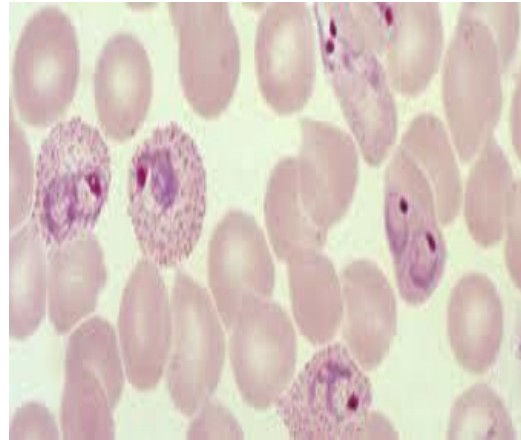


Figura 24. Gránulos de Shuffner.

Fuente:

<http://imagebank.hematology.org/AssetDetail.aspx?AssetID=3620>

Gránulos de Maurer: gránulos de color violeta oscuro que se encuentran en pacientes con parasitismo por *Plasmodium falciparum*.



Figura 25. Gránulos de Maurer.

Fuente:

<http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/>

Bibliografía

- Ahmad Shafique, Southall David, Bain Barbara J. A beginner's guide to blood cells. 2ed. Ed Blackwell Publishing. Londres. 2009.
- Carrasco Carrasco Manuel, Rubio Campal Faustina, García Espinosa Benjamín. Fundamentos y técnicas de análisis hematológicos y citológicos. Ed Sanitaria. México. 2004.
- Carrillo-Farga J. Hematología. Casos clínicos. Ed. Interamericana. México. 1996.
- Failace Renato. Hemograma. Manual de interpretación. 5ed. Ed Panamericana. Buenos Aires. 2012.
- Freund Mathias. Hematología. Guía práctica para el diagnóstico microscópico. 11ed. Ed Panamericana. Buenos Aires. 2011.
- González Barón Manuel. Anemia y cáncer. 1ed. Ed Panamericana. Buenos Aires. 2005.
- Jaime Pérez José Carlos. Hematología, la sangre y sus enfermedades. 2ed. Ed McGraw-Hill. México. 2009.
- McKenzie Shirlyn B. Hematología clínica. 2ed. Ed Manual Moderno, México. 2009.
- Mérida de la Torre Francisco Javier, Moreno Campoy Elvira Eva. Manual para técnico superior de laboratorio clínico y biomédico. Módulo VIII. Técnicas de análisis hematológico. 1ed. Ed Panamericana. Buenos Aires. 2015.
- Otero, Ana Maria. Hemostasia y trombos. 2ed. Ed Arena Libros. Madrid. 2007.
- Poulsen Keila B, Anderson Shauna. Anderson's atlas of hematology. 2ed. Ed Lippincott Williams & Wilkins. 2013.
- Rodak Bernadette, Carr Jacqueline H. Atlas de hematología clínica. 4ed. Ed Panamericana, Buenos Aires. 2015.
- Ruiz Argüelles Guillermo J., Ruiz Delgado Guillermo J. Fundamentos de hematología. 5ed. Ed Panamericana. Buenos Aires. 2014.
- Zerga Marta E., Tartas Norma E., Sánchez Ávalos Julio C. Las neoplasias linfoides. Manual de terapéutica y compendio de terapéutica. 1ed. Ed Panamericana. Buenos Aires. 2013.

ISBN 9978-978-13-119-0